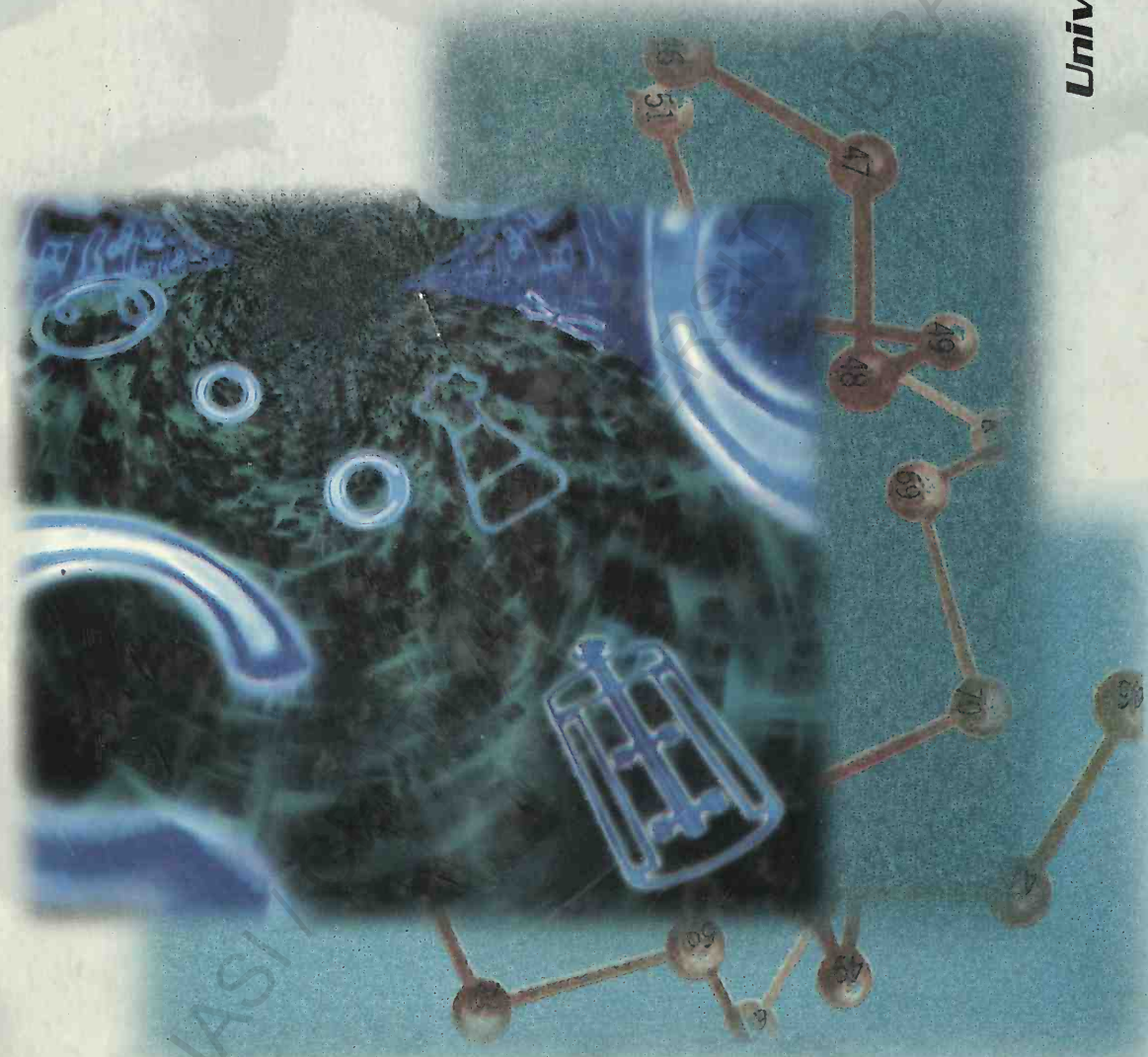
Ștefana Jurcoane

Universitaria



BIOTEHNOLOGII

Fundamente · Bioreactoare · Enzime

Editura Tehnică

III- 12643

Colecția

UNIVERSITARIA

ȘTEFANA JURCOANE

BIOTEHNOLOGII

FUNDAMENTE • BIOREACTOARE • ENZIME

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

051577
B.C.U. - IAȘI

Biotechnology

Recent developments in genetic and molecular biology have excited world-wide interest in biotechnology.

Scientific breakthroughs in gene expression and protein engineering are being translated by a strengthening biotechnology industry into revolutionary new products and services.

The primary aim of this book is to present the principles of microbial bioprocesses, in a way that is accessible to scientists.

The chapters are organised around the main subdisciplines: Fundamental biotechnology, Bioreactors and Enzime biotechnology. The variety of bioprocess industries is illustrated by typical examples. Also, the book contains aspects concerning the applications of genetics in biotechnology.

Copiilor mei,
Alina şi Aurelian Jurcoane

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Conf. dr. ŞTEFANA JURCOANE

Facultatea de Biotehnologie
UNIVERSITATEA DE ŞTIINŢE AGRONOMICE
ŞI MEDICINĂ VETERINARĂ
Bucureşti

BIOTEHNOLOGII

FUNDAMENTE • BIOREACTOARE • ENZIME

051577
B.C.U. - IASI

EDITURA TEHNICĂ
Bucureşti, 2000

130.000,00 lei

Copyright © 2000, S.C. Editura TEHNICĂ S.A.
Toate drepturile asupra acestei ediții sunt rezervate editurii

Adresă: S.C. Editura TEHNICĂ S.A.
Piața Presei Libere 1
33 București, România
cod 71341

42280
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
FIZICĂ
17.VIII.2000

Coperta colecției: ANDREI MĂNESCU

Redactor: OLGA STOIAN
Tehnoredactor: ANDREEA STAICU
Procesare P.C.: MARGARETA CHILIM
Copertă: SIMONA DUMITRESCU
VLAD OANCEA

Bun de tipar: 15.05.2000; coli tipar: 27
C.Z.U. 57; 577.15

ISBN 973-31-1465-0

Tipărit SEMNE

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUVÂNT ÎNAINTE

Rezultatele spectaculoase obţinute în ultimul timp în domeniul biologiei moleculare au pus bazele unor biotehnologii moderne cu impact economic şi social deosebit în viaţa cotidiană.

Bioprocesele constituie partea esenţială a unor procese specifice industriilor cum ar fi: chimice, alimentare, farmaceutice şi agroalimentare.

Dezvoltarea învăţământului biotehnologic necesită aprofundarea unor aspecte, prin aplicarea numeroaselor metode şi procedee noi, specifice biologiei moleculare, biologiei celulare, care conduc la îmbunătăţirea bioproceselor menţionate.

Descoperirile ştiinţifice din domeniul geneticii microorganismelor necesită o altfel de abordare a biotehnologiilor clasice. Procesele de biosinteză, realizate cu ajutorul microorganismelor, au cunoscut un ritm rapid de dezvoltare, datorită nevoilor tot mai mari ale omenirii de produse biologic active: aminoacizi, proteine, vitamine, antibiotice, produse agroalimentare şi furajere, enzime cu numeroase aplicaţii practice la nivel industrial etc., impunându-se obţinerea acestora cu randamente cât mai mari, prin metode nepoluante. Astfel, tehnologia ADN-recombinant reprezintă o cale de rentabilizare a tuturor proceselor din industria biotehnologică prin transferul genelor de interes la microorganismele producătoare. Pe de altă parte, tehnicile de inginerie genetică permit obţinerea de microorganisme capabile să metabolizeze deşeuri industriale din cele mai diverse, transformându-le, în final, în hrană şi energie.

În acest context, lucrarea de faţă, reuneşte aspecte esenţiale ale biotehnologiilor microbiene clasice, completate cu date recente referitoare la rentabilizarea acestora prin metodele ingineriei genetice. Volumul este

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

structurat în trei părţi cuprinzând atât noţiuni de bază referitoare la biologia şi genetica microorganismelor, metabolismul microbian, cinetica proceselor de biosinteză, izolarea şi purificarea produselor, cât şi tipuri de procese biotehnologice. De asemenea, lucrarea cuprinde un capitol special de "Bioreactoare", în care sunt descrise utilajele de bază implicate în tehnologiile de biosinteză, aplicate la nivel pilot şi industrial.

Pe baza unei bogate experienţe de cercetare în domeniul biotehnologiei, acumulată în timpul celor două decenii de activitate, în decursul cărora a fost un strălucit colaborator în cadrul secţiei de "Biosinteze" din Institutul de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti, reuşind să breveteze numeroase rezultate, autoarea acestei lucrări a reuşit sintetizarea aspectelor de bază implicate în procesele biotehnologice.

Cu toate că lucrarea se adresează, în primul rând, studenţilor de la facultăţile care au în structura lor profilul "Biotehnologie", cred că va fi la fel de utilă şi specialiştilor dornici să aprofundeze cunoştinţele noi în domeniul biotehnologiei şi bioingineriei.

Profesor univ. dr. I.F. Dumitru
Facultatea de Biochimie
Universitatea din Bucureşti

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

PREFAȚĂ 11

Partea întâi. FUNDAMENTELE BIOTEHNOLOGIEI 13

1. BIOTEHNOLOGIA – ISTORIC, PROCESE ȘI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE 15
   1.1. Definiția biotehnologiei; evoluția în timp a biotehnologiei ca știință tehnică 15
   1.2. Dezvoltarea industriei biotehnologice. Rolul cercetării fundamentale în biotehnologie 18
   1.3. Aplicații ale biotehnologiei în medicină, agricultură, industria alimentară, industria farmaceutică 21

2. MICROORGANISME – GENERALITĂȚI 24
   2.1. Caracterizarea microorganismelor de interes biotehnologic 24
      2.1.1. Bacteriile (*Schizomycetes*) 27
      2.1.2. Drojdiile 32
      2.1.3. Fungii (*Mycophyta*) 34
      2.1.4. Rolul și utilizarea microorganismelor în biotehnologii 41
   2.2. Taxonomia și nomenclatura 44
      2.2.1. Clasificarea și conceptul de specie 44
      2.2.2. Taxonomia bacteriană convențională 45
      2.2.3. Chemotaxonomia 46
      2.2.4. Taxonomia moleculară 48

3. METABOLISMUL MICROBIAN 57
   3.1. Bazele metabolismului 57
      3.1.1.Catabolismul 58
      3.1.2. Anabolismul 59
   3.2. Căi de degradare a substratului (catabolism) 60
      3.2.1. Glicoliza 61
      3.2.2. Calea hexozomonofosfaților 64
      3.2.3. Conexiuni între calea glicolizei și calea hexozomonofosfat 64
      3.2.4. Calea Entner-Doudoroff sau calea 2-ceto-3-deoxigluconat 65
      3.2.5. Ciclul acizilor tricarboxilici 67
   3.3. Căi de biosinteză a constituenților celulari (anabolism) 69
      3.3.1. Metaboliții microbieni primari 70
      3.3.2. Metaboliții microbieni secundari 71
      3.3.3. Trofofaza și idiofaza 71
      3.3.4. Relația între metabolismul primar și secundar 72
   3.4. Fermentații derivate din căile de biosinteză 73
      3.4.1. Fermentații derivate din calea hexozomonofosfatului 73
      3.4.2. Fermentații derivate din ciclul Krebs sau șuntul glioxilat 76
      3.4.3. Degradarea microbiană a altor glucide (decât glucoza) 78

4. CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ 82
   4.1. Dinamica multiplicării bacteriilor. Curba de creștere 82
      4.1.1. Dinamica procesului de creștere la fungi 85

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4.2. Influența factorilor de mediu asupra creșterii microorganismelor 86
4.2.1. Influența concentrației substratului asupra procesului de biosinteză 86
4.2.2. Influența dimensiunii inoculului 87
4.2.3. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor 88
4.2.4. Efectul *p*H-ului asupra creșterii microorganismelor 89
4.2.5. Concentrația de oxigen dizolvat 90

5. ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC 93
5.1. Faza de laborator 93
5.2. Faza de stație pilot 95
5.3. Medii de cultură 96

6. BIOREACTOARE 99
6.1. Stoechiometria proceselor de biosinteză 102
6.2. Modele matematice ale creșterii microbiene. Ecuația Monod 103
6.3. Concepte de bază în operarea bioreactoarelor 106
6.4. Caracterizarea bioreactoarelor 109
6.4.1. Bioreactorul discontinuu 109
6.4.2. Bioreactorul continuu 112
6.4.3. Bioreactorul cu recirculare externă 118
6.4.4. Bioreactorul ideal cu deplasare (*D*) (curgere tip piston) 120
6.4.5. Operarea bioreactoarelor în culturi extinse (cu adaosuri) 122
6.5. Configurația bioreactoarelor. Tipuri constructive 125
6.6. Descrierea bioreactoarelor pentru cultivare în sistem submers 131
6.6.1. Bioreactoare cu agitare mecanică 131
6.6.2. Bioreactoare cu agitare mecanică și cu draft interior 135
6.6.3. Bioreactoare cu aer comprimat 136
6.6.4. Bioreactoare cu dializă 140
6.7. Bioreactoare pentru culturi de suprafață 143
6.8. Bioreactoare cu enzime imobilizate 147
6.9. Alegerea bioreactoarelor 152

7. PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ÎN SCOPUL IZOLĂRII ȘI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ 156
7.1. Filtrarea mediilor de biosinteză 157
7.2. Dezagregarea celulelor de microorganisme 158
7.3. Concentrarea mediilor de biosinteză a enzimelor 159
7.4. Uscarea prin atomizare a mediilor de fermentație cu activitate enzimatică 160

Partea a doua. TIPURI DE PROCESE BIOTEHNOLOGICE 161

8. BIOPROCESE ANAEROBE 163
8.1. Fermentația alcoolică 164
8.2. Fermentația lactică. Probiotice 165
8.2.1. Microorganisme care produc fermentația lactică 166
8.2.2. Căile metabolice la bacteriile lactice 167
8.2.3. Fermentația lactică, echipamente și tehnologie 181
8.2.4. Tehnologia de obținere a acidului lactic și a sărurilor sale 184
8.2.5. Aplicații practice 192
8.2.6. Biosinteza bacteriocinelor 195
8.2.7. Probiotice 196

9. BIOPROCESE AEROBE 205
9.1. Obținerea prin biosinteză a acizilor organici 205
9.1.1. Tehnologia acidului gluconic 206
9.1.2. Tehnologia obținerii acidului citric 212
9.2. Biosinteza aminoacizilor 214
9.2.1. Biosinteza L-lizinei 215

9.2.2. Biosinteza acidului L-glutamic 241
9.3. Biosinteza antibioticelor 247
9.3.1. Antibioticele cu nucleu β- lactam şi cefalosporinele 249
9.3.2. Tipurile de peniciline 250
9.3 3. Cefalosporinele 256
9.3.4. Antibiotice produse de procariote 256
9.3.5. Macrolidele 258

Partea a treia. BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR 161

10. ENZIME DE FERMENTAŢIE – GENERALITĂŢI 263
10.1. Scurt istoric 263
10.2. Avantajele producerii enzimelor prin fermentaţie 266
10.3. Enzime microbiene cu aplicaţii industriale. Domenii de utilizare 268
10.2. Enzime intracelulare de fermentaţie 269
10.5. Enzime de fermentaţie, extracelulare 271
10.6. Enzime microbiene de uz biochimic 272

11. METODE DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR 274
11.1. Microorganisme producătoare de enzime 274
11.2. Selecţia tulpinilor şi ameliorarea lor 276
11.2.1. Alegerea tulpinii producătoare de enzime 276
11.2.2. Ameliorarea tulpinilor de microorganisme 277
11.2.3. Creşterea producţiei de enzime prin ameliorarea tulpinilor 282

12. ENZIME AMILOLITICE 284
12.1. Modul de acţiune al enzimelor amilolitice asupra amidonului 285
12.2. Tehnologii de biosinteză a α-amilazelor 288
12.2.1. Biosinteza α-amilazelor bacteriene 288
12.2.2. Izolarea α-amilazelor din mediul de biosinteză 300
12.3. Tehnologii de biosinteză a β-amilazelor 301
12.3.1.Tulpini modificate genetic, producătoare de β-amilaze 302
12.3.2. Amiloglucozidaze 303
12.4. Hidroliza enzimatică a amidonului utilizând preparate amilolitice de origine microbiană 303
12.4.1. Parametrii de control ai hidrolizei enzimatice 304
12.4.2. Compoziţia mediului de hidroliză 305

13. ENZIME CELULOZOLITICE 308
13.1. Microorganisme producătoare de celulaze 308
13.2. Hidroliza enzimatică a celulozei utilizând preparate celulozolitice de origine microbiologică 309
13.2.1. Procedeul I.F.P. de transformare a biomasei ligno-celulozice 311
13.2.2. Pretratări ale substratului lipo-celulozic 312
13.3. Producţia de enzime celulozolitice 314
13.4. Aplicaţii ale celulazelor şi hemicelulazelor 317

14. ENZIME PROTEOLITICE 319
14.1. Generalităţi asupra enzimelor proteolitice 319
14.2. Enzime implicate în degradarea proteinelor 320
14.2.1.Clasificarea enzimelor proteolitice 320
14.3. Mecanismul procesului de hidroliză enzimatică a proteinelor 323
14.3.1. Generalităţi privind cataliza enzimatică 323
14.3.2. Mecanismul de acţiune al proteazelor 326
14.4. Microorganisme producătoare de enzime proteolitice 331
14.5. Structura şi proprietăţile enzimelor proteolitice microbiene 334
14.5.1. Proteaze bacteriene biosintetizate de *Bacillus subtilis* 335

B.C.U. "P. Poni" IAŞI

14.5.2. Proteaze fungice din *Aspergillus oryzae* 340
14.6. Metode de izolare şi selecţie a microorganismelor producătoare de enzime proteolitice 341
14.6.1. Metoda inoculării pe un mediu minimal 341
14.6.2. Metoda difuziei radiale 342
14.6.3. Mutageneza 344
14.6.4. Fuziunea de protoplaşti 347
14.6.5. Metode de inginerie genetică 348
14.7. Biosinteza proteazelor bacteriene în sistem submers 355
14.7.1. Medii de cultură 356
14.7.2. Parametrii de cultivare 358
14.7.3. Dinamica biosintezei proteazelor neutre cu tulpini de *Bacillus subtilis* 362
14.7.4. Caracterizarea biochimică a proteazelor extracelulare produse cu tulpini de *Bacillus subtilis* 363
14.8. Biosinteza proteazelor fungice 367
14.8.1. Medii de cultură 367
14.8.2. Condiţii de cultivare 369
14.8.3. Dinamica biosintezei enzimelor proteolitice în culturi submerse de *Aspergillus oryzae* 370
14.8.4. Procedee de izolare şi purificare a enzimelor proteolitice fungice 371

15. ENZIME PECTOLITICE 387
15.1. Structura substratului asupra căruia acţionează enzimele pectolitice 387
15.2. Tipuri de enzimele pectolitice 388
15.3. Obţinerea enzimelor pectolitice cu ajutorul fungilor 391
15.4. Utilizarea enzimelor pectolitice 392

16. ENZIME LIPOLITICE 394
16.1. Obţinerea lipazelor din culturi microbiene 394
16.1.1. Microorganisme producătoare de lipaze 394
16.1.2. Obţinerea lipazelor în culturi submerse 396
16.1.3. Purificarea şi caracterizarea lipazelor microbiene 399
16.2. Aplicaţii ale lipazelor microbiene 401

17. GLUCOZOXIDAZA 402
17.1. Generalităţi. Oxidarea enzimatică a glucozei 402
17.2. Microorganisme producătoare de glucozoxidază 405
17.3. Biocinetica producerii glucozoxidazei în culturile cu tulpini de *Aspergillus niger* 407
17.3.1. Întreţinerea şi conservarea tulpinilor de *A. niger* 408
17.3.2. Prepararea inoculului pe mediu solid 409
17.3.3. Dezvoltarea inoculului vegetativ 409
17.3.4. Faza de bioproces 409
17.4. Extracţia şi izolarea glucozoxidazei din micelii de *Aspergillus niger* 411
17.5. Purificarea preparatelor enzimatice cu activitate glucozoxidazică 412
17.6. Condiţionarea prin liofilizare a preparatelor enzimatice de glucozoxidază 414
17.7. Proprietăţile glucozoxidazei din tulpini de *Aspergillus niger* 414
17.8. Fluxul tehnologic de obţinere a glucozoxidazei din tulpini de *Aspergillus niger* 415
17.9. Caracteristicile fizico-chimice şi biochimice ale preparatului purificat de glucozoxidază 417
17.10. Domenii de utilizare a glucozoxidazei 417

BIBLIOGRAFIE 419

PREFAȚĂ

Utilizarea microorganismelor la transformarea materialelor biologice în produse alimentare fermentate își are originile în antichitate. De atunci, bioprocesele s-au dezvoltat enorm, fiind utilizate mai ales în scopul obținerii unor produse comerciale, din materii prime ieftine, rezultate de cele mai multe ori ca subproduse ale altor tehnologii. Datorită extraordinarei viteze de înmulțire a microorganismelor, biosinteza diferitelor clase de compuși chimici devine economică în comparație cu metodele de sinteză. Procedeele de biosinteză prezintă, de asemenea, avantajul de a se desfășura în condiții blânde de pH, temperatură, presiune, ceea ce conduce la evitarea coroziunii utilajelor și la costuri scăzute pentru combustibili și energie.

În țara noastră, industria de biosinteză s-a dezvoltat începând cu anul 1955, când s-a construit Fabrica de Antibiotice Iași. În afară de antibiotice, pe aceste instalații s-au mai produs în anumite perioade de timp: aminoacizi, (L-lizina), biostimulatori, vitamine, enzime (α-amilază). Ulterior, s-au construit fabricile "Bioproteine" Curtea de Argeș, producătoare de proteine din petrol, și apoi "Biosin" Calafat, profilată pe concentrate furajere (lizină, glutamat de sodiu, subtilază). Tehnologiile aplicate pe aceste instalații au fost elaborate de colective de cercetători aparținând unor instituții de profil și universități din București, Iași, Galați, Timișoara, Cluj. Aceste colective au contribuit, în același timp, la dezvoltarea învățământului biotehnologic în țara noastră prin înființarea de secții de profil în universități și implementarea metodelor moderne de investigație în domeniul biotehnologiei.

În acest context lucrarea de față, intitulată "Biotehnologii", reprezintă o sinteză a principalelor aspecte legate de obținerea cu ajutorul

BCU "CAROL I" BUCHAREST LIBRARY

microorganismelor a celor mai cunoscute clase de compuşi (aminoacizi, enzime, proteine, acizi organici, antibiotice etc.), completată cu date ştiinţifice recente apărute în domeniu, în special metode referitoare la ridicarea capacităţii productive a tulpinilor producătoare prin metodele ingineriei genetice.

Lucrarea urmăreşte, îndeaproape, o parte din tematica cursului de "Biotehnologie generală. Bioreactoare", prezentată studenţilor din Facultatea de Biotehnologii, Universitatea de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară Bucureşti. Se adresează, în primul rând, studenţilor de la facultăţile care au în structura lor profilul "Biotehnologie", precum şi specialiştilor şi celor ce vor să-şi aprofundeze cunoştinţele în domeniul biotehnologiei şi bioingineriei.

Pe parcursul elaborării volumului, am primit permanent sprijinul doamnei Săsărman Elena, cercetător de marcă în domeniul microbiologiei industriale, căreia vreau să-i mulţumesc pe această cale.

Mulţumesc, în acelaşi timp, prof. univ. dr. I.F. Dumitru, prof. univ. dr. Gheorghe Câmpeanu, prof. univ. dr. Muntean Ovidiu şi prof. univ. Niculiţă Petru pentru amabilitatea şi răbdarea de a fi parcurs fiecare o parte din material.

De asemenea, mulţumesc tuturor colegilor din Facultatea de Biotehnologii a Universităţii de Ştiinţe Agronomice şi Medicină Veterinară Bucureşti şi celor din Institutul de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti, care m-au susţinut moral pe parcursul elaborării acestei lucrări.

Conf. dr. ing. ŞTEFANA JURCOANE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA ÎNTÂI

FUNDAMENTELE BIOTEHNOLOGIEI

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- BIOTEHNOLOGIA - ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE
- GENERALITĂŢI ASUPRA MICROORGANISMELOR
- METABOLISMUL MICROBIAN
- CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ
- ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC
- BIOREACTOARE
- PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ
- ÎN SCOPUL IZOLĂRII ŞI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1 BIOTEHNOLOGIA – ISTORIC, PROCESE ŞI PRODUSE BIOTEHNOLOGICE

1.1. DEFINIŢIA BIOTEHNOLOGIEI; EVOLUŢIA ÎN TIMP A BIOTEHNOLOGIEI CA ŞTIINŢĂ TEHNICĂ

Descoperirile spectaculoase din domeniile biologiei, biochimiei, microbiologiei, geneticii, enzimologiei, precum şi necesitatea aplicării acestor cunoştinţe în practică au condus la apariţia unei noi ştiinţe denumită generic "biotehnologie".Caracterul interdisciplinar al biotehnologiei a creat încă de la început probleme privind definirea şi localizarea ei ca ştiinţă de sine stătătoare.

Cuvântul "biotehnologie" este format din doi termeni: "bio" venind de la grecescul "bios", însemnând "viaţă" şi din care a derivat mai târziu cuvântul "biologie", şi "tehnologie" venind de la grecescul "technologia", însemnând "studiul tehnic al utilajelor, maşinilor, materialelor".Dacă biologia a fost la început o ştiinţă a naturii, o ştiinţă de laborator, biotehnologia este acum o ştiinţă pluridisciplinară, tehnică, "ştiinţa inginerului". Biotehnologia utilizează materia vie pentru degradarea, sinteza şi producerea de materiale (prin bioconversie-biosinteză) în scopul unei activităţi agronomice sau industriale, acompaniind în final un progres social şi economic.Ea apelează pe scară largă la enzime libere sau fixate,la microorganisme, structuri celulare şi subcelulare active (biocatalizatori, anticorpi) la o inginerie sofisticată.

Dintre toate definiţiile, aceea dată biotehnologiei de către Federaţia Europeană de Biologie (1978), pare a fi satisfăcătoare:

"*Utilizarea integrată a biochimiei, microbiologiei şi ingineriei în scopul obţinerii unei aplicaţii tehnologice (industriale), cu ajutorul microorganismelor, culturilor de celule şi a părţilor componente ale acestora*".

Deci, în esenţă,principalul scop al biotehnologiei este obţinerea de produse sau servicii utile activităţii umane, cu ajutorul organismelor vii.

Procesul de bază în biotehnologie este "proces biologic", după cum procesul de bază în tehnologia chimică este "proces chimic"

În tabelul 1.1 poate fi urmărită natura produselor comerciale obținute pe cale biotehnologică utilizînd diferite tipuri de celule.

Tabelul 1.1

Produse majore obținute pe cale biotehnologică

Produse de fermentație	Tipul de organism utilizat	Producție anuală (în lume) kg/an
1	2	3
Solvenți organici		
Etanol(nu pentru băuturi)	*Sacharomyces cerevisiae*	$2 \cdot 10^{10}$
Acetonă/butanol	*Clostridium acetobutylicum*	$2 \cdot 10^{6}$ (butanol)
Biomasă		
Culturi starter și drojdii pentru industria alimentară și agricultură	Bacterii lactice sau drojdii de panificație	$5 \cdot 10^{8}$
Proteine monocelulare	*Pseudomonas methylotrophus* sau *Candida utilis*	$0{,}5–1 \cdot 10^{8}$
Acizi organici		
Acid citric	*Aspergillus niger*	$2–3 \cdot 10^{8}$
Acid gluconic	*Aspergillus niger*	$5 \cdot 10^{7}$
Acid lactic	*Lactobacillus delbrueckii*	$2 \cdot 10^{7}$
Acid itaconic	*Aspergillus itaconicus*	
Aminoacizi		
Acid L-glutamic	*Corynebacterium glutamicum*	$3 \cdot 10^{8}$
L-Lysină	*Brevibacterium flavum*	$3 \cdot 10^{7}$
L-Fenilalanină	*Corynebacterium glutamicum*	$2 \cdot 10^{6}$
L-Arginină	*Brevibacterium flavum*	$2 \cdot 10^{6}$
Alți aminoacizi	*Corynebacterium spp.*	$1 \cdot 10^{6}$
Transformări microbiene		
Steroizi	*Rhizopus arrhizus*	
D-Sorbitol la L-sorboză (în producția de vitamina C)	*Acetobacter suboxydans*	$4 \cdot 10^{7}$
Polizaharide extracelulare		
Xanthan	*Xanthonomas campestris*	$5 \cdot 10^{6}$
Dextran	*Leuconostoc mesenteroides*	
Nucleotide		
5'- Guanosin monofosfat	*Brevibacterium ammoniagenes*	$1 \cdot 10^{5}$

Tabelul 1.1 (continuare)

1	2	3
Enzime		
Proteaze	*Bacillus* spp.	$6 \cdot 10^5$
α-Amilaze	*Bacillus amyloliquefaciens*	$4 \cdot 10^5$
Glucoamilaze	*Aspergillus niger*	$4 \cdot 10^5$
Glucozizomerază	*Bacillus coagulans*	$1 \cdot 10^5$
Pectinaze	*Aspergillus niger*	$1 \cdot 10^4$
Rennină	*Mucor miehei* sau drojdie recombinantă	$1 \cdot 10^4$
Toate celelalte enzime		$5 \cdot 10^4$
Vitamine		
B_{12}	*Proppionibacterium shermanii* sau *Pseudomonas denitrificans*	$1 \cdot 10^4$
Ribovlavină	*Eremothecium ashbyii*	
Alcaloide Ergot	*Claviceps paspali*	$5 \cdot 10^3$
Pigmenti		
Shinokin	*Lithospherum erythrorhizon* (culturi de celule vegetale)	60
β-Carotene	*Blakeslea trispora*	
Vaccinuri împotriva:		
– difteriei	*Corynebacterium diphtheriae*	<50
– tetanosului	*Clostridium tetani*	
– pertussisului (tusea convulsivă)	*Bordetella pertussis*	
– virusului poliomielitei	Viruşi activi atenuaţi crescuţi în rinichi de maimuţă sau în celulele diploide umane	
– rubeolei	Viruşi activi atenuaţi crescuţi în rinichi de hamster tânăr	
– hepatitei B	Antigen de suprafaţă evidenţiat în drojdia recombinantă	
Proteine terapeutice		
Insulina	*Escherichia coli* recombinantă	<20
Hormonul creşterii	*Escherichia coli* recombinantă sau celule de mamifere recombinante	
Eritropoietina	Celule de mamifere recombinante	
Factorul VIII-C	Celule de mamifere recombinante	
Activatorul plasminogen de ţesut	Celule de mamifere recombinante	
Interferonul-α_2	Recombinanţi de *Escherichia coli*	

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 1.1 (continuare)

1	2	3
Insecticide Spori bacterieni Spori de fungi	*Bacillus thuringienis* *Hirsutella Thompsonii*	
Antibiotice Peniciline Cefalosporine Tetracicline (exemplu:7-clortetraciclina) Antibiotice macrolide (exemplu: eritromicina) Antibiotice polipeptide (exemplu: gramicidina) Antibiotice aminoglicoside (exemplu: streptomicina) Antibiotice aromatice (exemplu: griseofulvina)	*Penicillinum chrysogenum* *Cephalosporium acremonium* *Streptomyces aureofaciens* *Streptomyces erythreus* *Bacillus brevis* *Streptomyces griseus* *Penicillium griseofulvum*	$3–4 \cdot 10^7$ $1 \cdot 10^7$ $1 \cdot 10^7$ $2 \cdot 10^6$ $1 \cdot 10^6$
Anticorpi monoclonali	Celule Hybridoma	<20

1.2. DEZVOLTAREA INDUSTRIEI BIOTEHNOLOGICE. ROLUL CERCETĂRII FUNDAMENTALE ÎN BIOTEHNOLOGIE

Cunoaşterea ştiinţifică şi strategia de dezvoltare economică actuală se bazează pe o nouă abordare a fenomenelor, acestea conducând la o adevărată revoluţie biotehnologică. Se apreciază că în viitor cea mai mare parte a industriei se va baza pe procedee de fermentaţie, inginerie biochimică, biologie moleculară, aceasta din urmă imprimând un salt tehnologic corespunzător. Pe aceste baze, industria biotehnologică va lua un avânt considerabil.

Ingineria genetică este considerată a fi tehnica ideală capabilă să amelioreze cantitativ şi calitativ capacitatea de biosinteză a celulelor de microorganisme,animale sau vegetale, în scopul obţinerii unor produse utile.

Natura interdisciplinară a biotehnologiei este evidentă dacă se ţine seama de etapele unui proces biotehnologic complet. Dacă se ia ca exemplu obţinerea unui produs nou ADN-recombinant, cum ar fi insulina, hormonul de creştere sau interferonul, atunci, de la idee până la obţinerea unui produs comercial, se parcurg

mai multe faze care implică cunoştinţe aparţinând unor domenii ştiinţifice foarte diferite (fig.1.1).

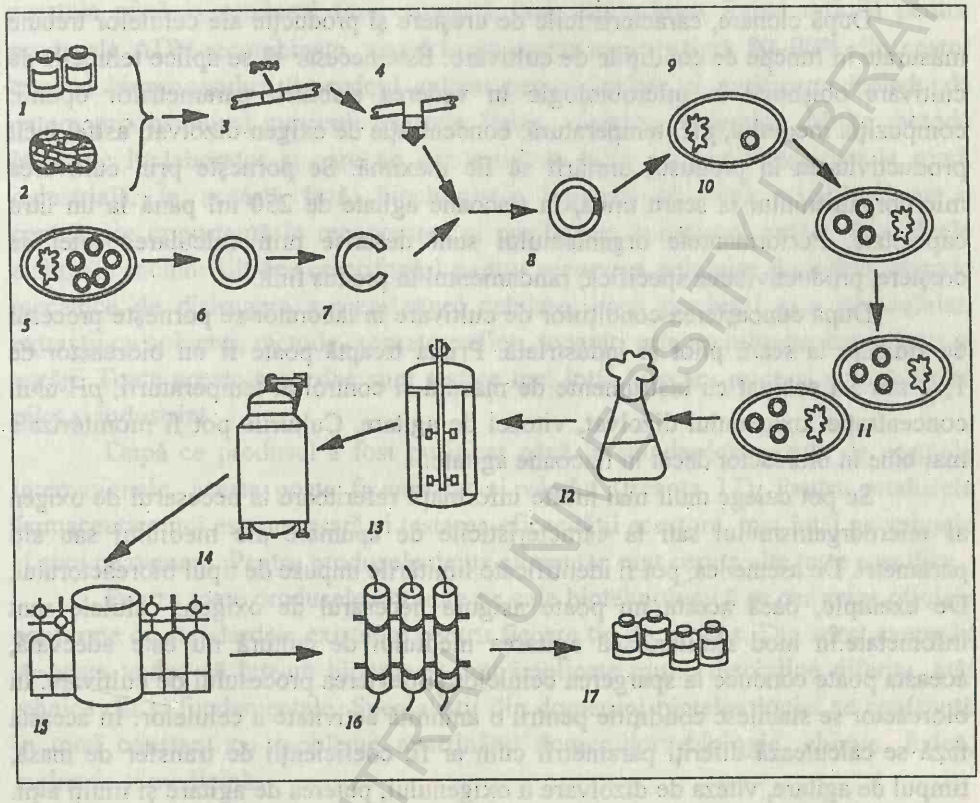


Fig. 1.1. Treptele unui proces biotehnologic complet de obţinere a noi produse aplicând tehnica ADN-recombinant:

1-substanţe chimice; 2-ţesut animal; 3-cromozom animal; 4-genă tăiată dintr-un cromozom; 5-microorganism, ca de exemplu *E.coli*; 6-plasmidă; 7-plasmidă secţionată; 8-plasmidă recombinant; 9-introducere în microorganism; 10-multiplicarea plasmidei şi expresia genei; 11-diviziune celulară; 12-cultivare în laborator; 13-bioreactor de laborator; 14-bioreactor pilot; 15-operare la scară industrială; 16-recuperarea produsului; 17-condiţionare şi vânzare.

Prima treaptă de dezvoltare a bioprocesului se referă la manipularea genetică a organismului gazdă; în acest caz, o genă din ADN-ul animal este clonată într-o celulă de *Escherichia coli*. Aceste operaţii aparţinând domeniului ingineriei genetice sunt realizate în laborator de către oameni de ştiinţă instruiţi în domeniul biologiei moleculare şi biochimiei. Instrumentele utilizate în această fază constau în plăci Petri, micropipete, microcentrifuge, enzime de restricţie în cantităţi foarte mici(de ordinul nano- ori microgramelor), geluri de electroforeză pentru separarea

şi identificarea ADN-ului. Parametrii cei mai importanţi în acest stadiu al cercetării fundamentale sunt: stabilitatea tulpinii recombinant obţinute şi nivelul de expresie al produsului dorit.

După clonare, caracteristicile de creştere şi producţie ale celulelor trebuie măsurate în funcţie de condiţiile de cultivare. Este necesar să se aplice tehnicile de cultivare obişnuite în microbiologie în vederea stabilirii parametrilor optimi: compoziţia mediului, *p*H, temperatură, concentraţie de oxigen dizolvat, astfel încît productivitatea în produsul urmărit să fie maximă. Se porneşte prin cultivarea microorganismului la scara mică, în flacoane agitate de 250 ml până la un litru capacitate. Performanţele organismului sunt descrise prin calcularea ratei de creştere, productivitatea specifică, randamentul în produs finit.

După cunoaşterea condiţiilor de cultivare în laborator se porneşte procesul de ridicare la scară pilot şi industrială. Prima treaptă poate fi un bioreactor de 1; 2 sau 5 l echipat cu instrumente de măsură şi control al temperaturii, *p*H-ului, concentraţiei oxigenului dizolvat, vitezei de agitare. Culturile pot fi monitorizate mai bine în bioreactor decât în flacoane agitate.

Se pot culege mult mai multe informaţii referitoare la necesarul de oxigen al microorganismului sau la caracteristicile de spumare ale mediului sau alţi parametri. De asemenea, pot fi identificate limitările impuse de tipul bioreactorului. De exemplu, dacă acesta nu poate asigura necesarul de oxigen, celulele sunt înfometate.În mod similar,dacă agitarea mediului de cultură nu este adecvată, aceasta poate conduce la spargerea celulelor şi devierea procesului de cultivare. În bioreactor se stabilesc condiţiile pentru o anumită activitate a celulelor. În această fază se calculează diferiţi parametrii cum ar fi: coeficienţii de transfer de masă, timpul de agitare, viteza de dizolvare a oxigenului, puterea de agitare şi mulţi alţii. Aici se decide dacă cultura de celule poate fi operată cel mai bine în sistem "batch", semicontinuu sau continuu. De asemenea, pot fi încercate diferite tipuri de bioreactor. Se realizează, de asemenea, un calcul economic de fezabilitate.

Următoarea treaptă de ridicare la scară (notată cu 14 în fig. 1.1) este aceea de bioreactor pilot. În această fază se implică specialiştii instruiţi în ingineria bioproceselor şi în ridicarea la scară industrială a acestora. Acum se construiesc bioreactoare de 100–1000 l după specificaţiile prototipului de laborator. Scopul fazei pilot este acela de a examina răspunsul celulelor cultivate la o scară mai mare. În această treaptă de operare, rezultatele pot fi mai bune sau mai scăzute faţă de cele obţinute în bioreactorul-laborator. În funcţie de aceste rezultate se hotărăşte dacă se trece la producţia industrială sau nu (treapta 15). Această parte a procesului tehnologic aparţine în întregime ingineriei bioproceselor. Acum se proiectează atât bioreactorul industrial cât şi facilităţile auxiliare: echipamente de sterilizare aer şi mediu, generator de abur, utilaje necesare preparării mediilor de cultură, sistem de apă de răcire, aparatură de automatizare şi control. O importanţă deosebită se

acordă faptului că instalaţia trebuie să asigure condiţii aseptice pe întreg fluxul de producţie. O parte importantă a unui proces biotehnologic o constituie faza de recuperare a produsului din mediul de producţie şi anume izolarea şi purificarea acestuia până la produsul finit. Această fază este adesea foarte dificilă pentru produsele ADN-recombinate, astfel încât costurile reprezintă 80–90% din costul total al bioprocesului. Procedeul aplicat pentru izolare şi purificare depinde de natura produsului şi cuprinde metode fizice, chimice, biologice. Multe metode încercate în laborator şi care au dat rezultate bune nu pot fi aplicate la scară industrială. În această fază, biochimiştii, inginerii chimişti, tehnologii au o contribuţie importantă în recuperarea şi purificarea substanţei active. Procedeele elaborate includ: filtrări, centrifugări pentru separarea celulelor de lichid, metode mecanice de distrugere a membranei celulare, dacă produsul este intracelular, extracţii cu solvenţi, metode cromatografice, separări prin membrane, cristalizări şi uscări. Toate aceste procedee sunt testate mai întâi la scara mică şi apoi la scară pilot şi industrial.

După ce produsul a fost purificat până la standardele cerute de normele internaţionale, acesta poate fi ambalat şi vândut (treapta 17). Pentru produsele farmaceutice noi este necesară şi testarea eficacităţii acestora, mai întâi pe animale şi apoi pe oameni. Pentru produsele de uz alimentar sunt cerute alte teste specifice.

Pentru toate produsele obţinute pe cale biotehnologică se cer avize oficiale conforme cu standardele existente pentru fiecare tip de produs. Din acest exemplu se poate vedea că într-un bioproces sunt implicate multe discipline diferite, atât tehnice cât şi fundamentale. Specialiştii din domeniul biotehnologiei se confruntă în mod constant cu probleme aparţinând domeniilor: biologie, chimie, fizică, inginerie şi medicină.

1.3. APLICAŢII ALE BIOTEHNOLOGIEI ÎN MEDICINĂ, AGRICULTURĂ, INDUSTRIA ALIMENTARĂ, INDUSTRIA FARMACEUTICĂ

Sfera domeniilor de aplicabilitate a biotehnologiilor este foarte mare, dată fiind varietatea proceselor biotehnologice.

Principalele direcţii de dezvoltare a biotehnologiilor moderne sunt determinate, în primul rând, de descoperirile recente din domeniul biologiei moleculare, iar în al doilea rând de cerinţele societăţii faţă de anumite aspecte cu care se confruntă în prezent: criza energetică, epuizarea rezervelor de hrană de pe planetă, probleme ecologice şi de bioremediere.

Încercând o clasificare a diferitelor tipuri de biotehnologii, în funcție de domeniul în care se aplică sau de tipul de celule utilizate, observăm că este greu să realizăm o delimitare. Orice manipulare a viului în folosul societății înseamnă biotehnologie. Indiferent dacă aceasta se realizează la nivel de laborator, având un caracter de cercetare fundamentală, sau la nivel industrial, având un caracter aplicativ, scopul final și în general tehnicile sunt asemănătoare și incluse în aceeași sferă largă a biotehnologiei.

În funcție de tipul de celule cu care se lucrează, deosebim: biotehnologii: *microbiene*, *vegetale* și *animale*.

În funcție de domeniul în care își găsesc aplicații produsele obținute pe cale biotehnologică deosebim:

- *biotehnologii industriale* (farmaceutice, alimentare și de depoluare);
- *biotehnologii agricole* (vegetale și în zootehnie);
- *biotehnologii medical-veterinare*.

Biotehnologiile industriale cuprind procedee de obținere a unor produse de larg interes, la nivel industrial, utilizând microorganisme sau enzime. În categoria biotehnologiilor farmaceutice intră:

- producerea de biomasă proteică;
- biosinteza antibioticelor;
- producția de acizi organici;
- producția de: aminoacizi, enzime, obținerea de probiotice, hormoni, vitamine, polizaharide.

În funcție de gradul de puritate, produsele obținute pot fi utilizate atât pentru consumul uman cât și pentru cel animal.

Biotehnologiile alimentare cuprind procedee industriale de prelucrare a legumelor și fructelor, a laptelui și produselor lactate, a cărnii, vizând, în general, aspectele fermentative ale acestora.

În cadrul biotehnologiilor de depoluare a mediului sunt incluse toate metodele și tehnicile de epurare biologică a apelor uzate sau poluate, a aerului sau a solurilor degradate, extracția de minereuri cu ajutorul microorganismelor.

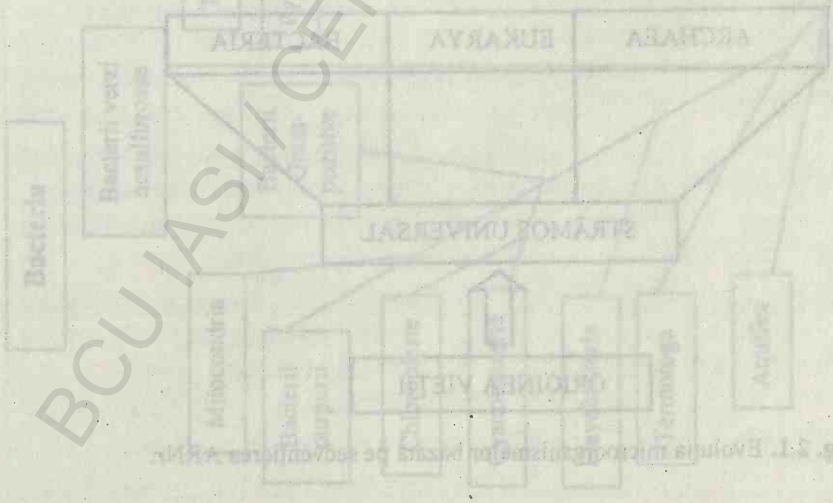
Biotehnologiile agricole vizează un domeniu larg și anume acela referitor la manipularea celulelor vegetale și în acest caz le denumim biotehnologii vegetale (*plant biotechnology*) sau a celor animale (*animale biotechnology*). În acest din urmă caz deosebim: biotehnologii în zootehnie și biotehnologii medical-veterinare, acestea putând fi clasificate separat.

Biotehnologiile vegetale studiază aspecte privind rezistența plantelor la atacul factorilor patogeni și ale toleranței față de factori de mediu defavorabili, implementarea de sisteme simbiotice la diferite specii de plante, multiplicarea speciilor horticole și obținerea de noi hibrizi sexuați.

Biotehnologiile din domeniul zootehniei se referă în special la: nutriţia animală; creşterea rezistenţei animalelor la atacul factorilor patogeni; biotehnici de reproducţie artificială şi de predeterminare a sexului la animale; conservarea resurselor genetice animale.

Biotehnologiile medical-veterinare au ca scop, în principal, crearea unor sisteme de diagnostic rapid şi eficient al maladiilor sau dereglărilor funcţionale la om şi la animale, producerea unor sisteme biologice de combatere a bolilor (anticorpi monoclonali, vaccinuri şi bacterii antagoniste).

Este necesar de remarcat faptul că saltul ştiinţific înregistrat în fiecare din domeniile biotehnologiei, enunţate anterior, nu ar fi fost posibil fără aplicarea tehnicilor noi de biologie moleculară, mai concret de inginerie genetică. Aceasta utilizează transferul de gene şi clonarea moleculară pentru obţinerea unor noi tipuri de celule şi organisme; astfel este posibilă obţinerea de linii celulare noi, pentru medicină, agricultură, zootehnie, industria alimentară. Încorporarea unor gene dorite, utile, conduce la obţinerea unor produse noi de interes medical sau industrial.



BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITARĂ

2 MICROORGANISME – GENERALITĂȚI

2.1. CARACTERIZAREA MICROORGANISMELOR DE INTERES BIOTEHNOLOGIC

Unul dintre domeniile cele mai provocatoare ale microbiologiei este biotehnologia. În sensul larg al cuvântului, biotehnologia presupune folosirea microorganismelor în procesele aplicate industrial. În prezent prin biotehnologie se înțelege aplicarea tehnicilor geneticii moleculare în scopul construirii de noi microooorganisme capabile să sintetizeze produse cu o valoare comercială ridicată. În acest sens, biotehnologia este dependentă de ingineria genetică, disciplină care se referă la manipularea genelor și a produsului acestora.

Diversitatea microorganismelor implicate în biotehnologii este extrem de mare, cuprinzând reprezentanți atât dintre procariote (bacterii) cât și eucariote (drojdii sau fungi).

Studiile efectuate pe secvențe de ARN ribozomal au permis stabilirea a trei direcții distincte de evoluție, două aparținând structurii de tip procariot și una de tip eucariot (fig. 2.1.)

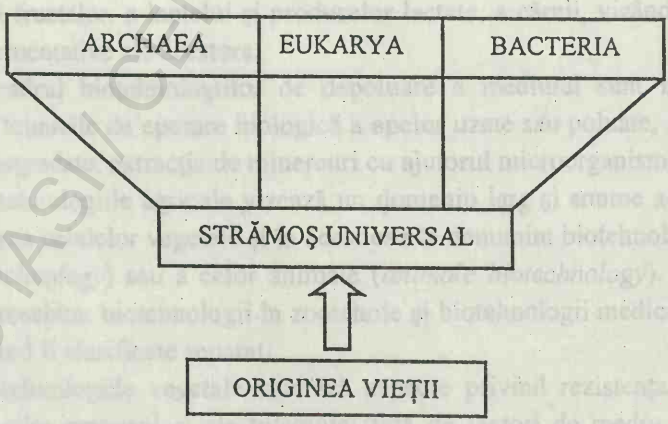


Fig. 2.1. Evoluția microorganismelor bazată pe secvențierea ARN*r*.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

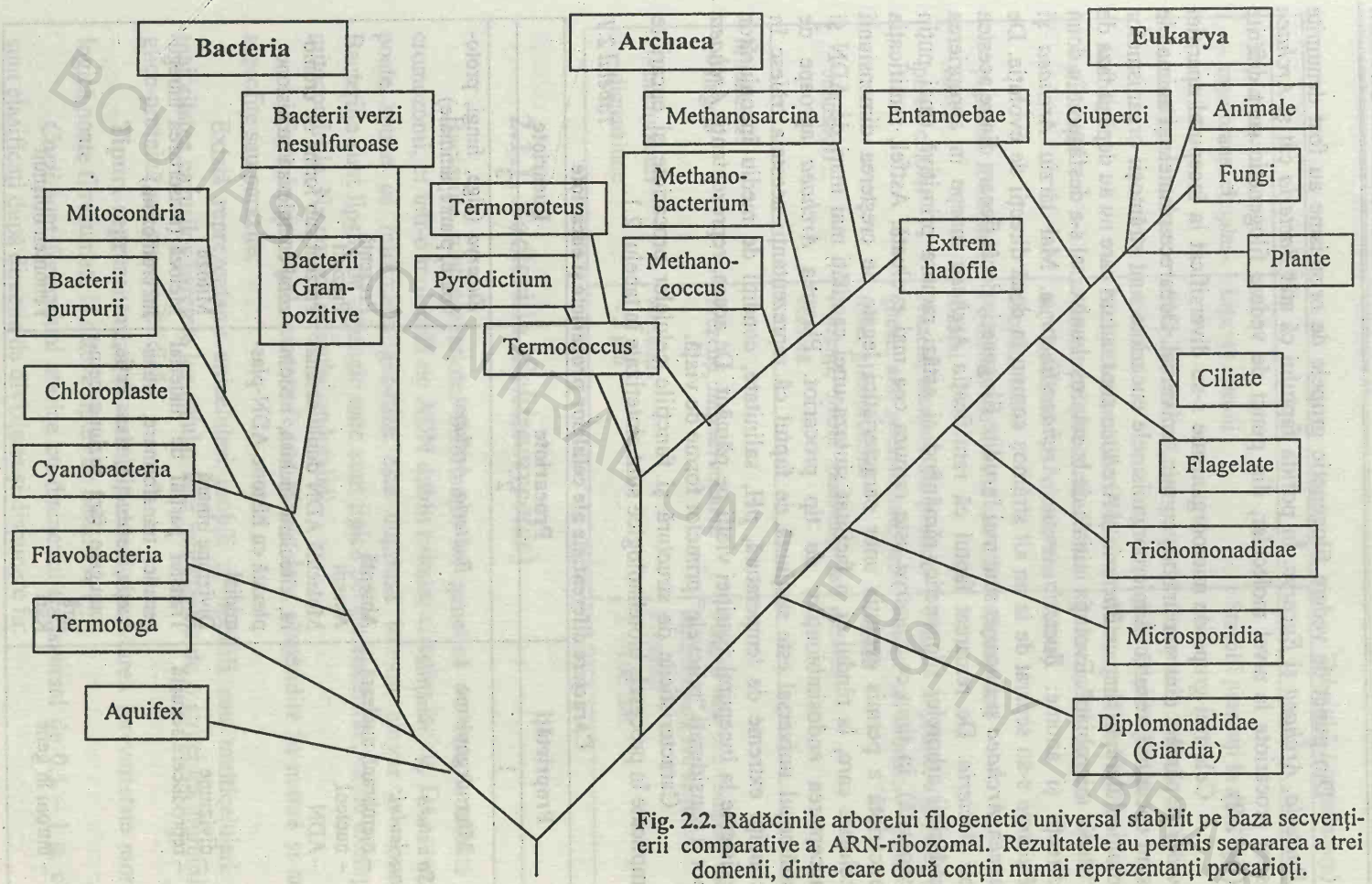


Fig. 2.2. Rădăcinile arborelui filogenetic universal stabilit pe baza secvenţierii comparative a ARN-ribozomal. Rezultatele au permis separarea a trei domenii, dintre care două conţin numai reprezentanţi procarioţi.

BCU IAŞI CONSTANTIN UNIVERSITY LIBRARY

Din punct de vedere filogenetic grupele de organisme au fost denumite *Bacteria*, *Archaea* şi *Eucarya*. În pofida faptului că atât *Bacteria* cât şi *Archaea* sunt procariote la nivel molecular, din punct de vedere filogenetic sunt diferite (fig. 2.2).

Cele trei grupe de microorganisme s-au diversificat la începutul apariţiei vieţii pe pământ dintr-un strămoş comun, universal. Deoarece plantele şi animalele sunt eucariote, rezultă că microorganismele eucariote sunt strămoşii organismelor multicelulare, în timp ce *Bacteria* şi *Archaea* sunt ramuri care nu au depăşit faza de "stadiu microbian". Evoluţia iniţială de la stămoşul universal s-a desfăşurat în două direcţii şi anume: *Bacteria versus Archaea/Eucarya*. Mai târziu *Archaea* şi *Eucarya* s-au separat de la un alt strămoş comun în două direcţii de evoluţie. De aceea, *Archaea* şi *Eucarya* sunt mai înrudite filogenetic decât fiecare dintre acestea cu *Bacteria*. De remarcat faptul că ramificaţia *Archaea* începe în apropierea rădăcinii arborelui filogenetic, rămânând şi astăzi ramura primitivă (mai puţin evoluată), în timp ce *Eucarya* este ramura cea mai evoluată. Astfel, ramificaţia eucariotă a permis evoluţia unor caracteristici legate de creşterea dimensiunii celulare care, la rândul ei, a facilitat sinteza unei cantităţi mai mari de ADN şi acceptarea endosimbionţilor de tip procariot. Plasarea *Archaea* aproape de strămoşul universal este susţinută de faptul că reprezentanţii acesteia trăiesc în condiţii extreme de temperatură, *p*H, salinitate, condiţii de mediu înconjurător existente la începutul apariţiei vieţii pe pământ. De aceea, reprezentanţii *Archaea* pot fi consideraţi "relicvele" primelor forme de viaţă.

Caracteristicile de structură şi funcţiile celulelor procariote şi eucariote implicate în procesele biotehnologice sunt sintetizate în tabelul 2.1.

Tabelul 2.1

Caractere diferenţiale ale celulelor procariote şi eucariote

Proprietăţi	Procariote	Eucariote
1	2	3
Microorganisme	*Bacteria, Archaea*	*Eucarya* (alge, fungi, protozoare, plante, animale)
Structura şi funcţiile nucleului:		
– membrană nucleară	Absentă	Prezentă
– nucleol	Absent	Prezent
– ADN	Moleculă ADN dublu catenară, circulară închisă, necomplexată cu histone ADN-plasmidial	Prezent sub formă de cromozomi complexaţi cu histone
– diviziune	Diviziune binară	Mitoză
– reproducere sexuată	Transfer parţial de material genetic: transformare, transducţie, sexducţie, transfecţie, conjugare fără fuziune celulară	Meioză (reasortarea întregului cromozom)
– introni în gene	Rari	Fenomen obişnuit

Tabelul 2.1 (continuare)

1	2	3
Citoplasma:		
– membrana citoplasmatică	Lipsesc sterolii	Sterolii prezenţi în mod obişnuit
– membrane interne	Simplă, limitată la grupuri specifice	Complexe, reticul endoplasmatic, aparat Golgi
– ribozomi	Mulţi ribozomi liberi 70S	Ribozomi liberi 80S
– respiraţia	Absente mitocondriile. Enzime localizate pe membrana citoplasmatică	Mitocondrii (organe specializate).
– pigmenţi fotosintetizanţi	Pe membrana internă sau clorozomi	Cloroplaste
– perete celular	Prezent, compus din peptidoglican, alte polizaharide, proteine, glicoproteine	Prezent la plante, alge, fungi, absent la animale – polizaharide
– endospori	Prezenţi, foarte rezistenţi la căldură	Absent
Mobilitate:		
– flageli	Prezenţi, mişcări rotative	Flageli sau cili compuşi din microtuburi. Nu se rotesc
– microtuburi	Absenţi	Prezenţi
– dimensiune	< 2 μm	2 – 100 μm

2.1.1. Bacteriile (*Schizomycetes*)

Bacteriile sunt procariote. Informaţia lor genetică nu este localizată în cromozomi, ci într-o moleculă de ADN dublu catenar circular închis. De aceea se poate spune că informaţia genetică este cuprinsă într-un singur cromozom. Bacteriile sunt lipsite de organele care sunt tipice pentru eucariote, ca de exemplu mitocondriile. Nu posedă reticulul endotelial.

Sunt în principal heterotrofe, se găsesc larg răspândite în natură şi sunt saprofite sau parazite.

Există reprezentanţi unicelulari mobili şi imobili sau multicelulari. În majoritatea cazurilor peretele lor celular este reprezentat de o structură mureinică, glico-proteină sau mucopeptidică.

Tipuri reprezentative de celule bacteriene. Marea lor varietate morfologică poate fi rezumată la câteva tipuri de bază:

Cocii sunt formaţiuni sferice cu diametrul transversal de 0,5 – 1 μ, care sunt clasificaţi după direcţia de diviziune şi dispunere în:

– *diplococi* – prezintă o direcţie de diviziune, rezultând două celule care aderă una de alta: ∞ ;

– *streptococi* – prezintă, de asemenea, o singură direcţie de diviziune cu mai multe celule dispuse în lanţ: ∞∞∞ ;

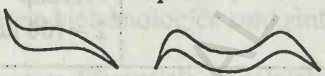
– *tetracoci* – prezintă două direcţii de diviziune, ceea ce duce la formarea unei tetrade: ⁂ ;

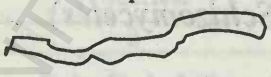
– *stafilococi* – prezintă trei direcţii de diviziune care conduc la un aranjament neregulat al celulelor: ;

– *sarcina* – prezintă trei direcţii de diviziune, cu aranjament în cub: .

Bacilii sunt formaţiuni cilindrice cu extremităţi rotunjite sau drepte: ;

Vibrionii sunt celule sub formă de virgulă: .

Spirilii sunt celule care prezintă câteva curburi având extremităţile ascuţite (lungimea = 50μ):  .

Spirilochetele sunt celule care prezintă multe curburi, fapt care le conferă flexibilitate (lungime 60μ):  .

Corineformele sunt forme neregulate (reprezentant *Corynebacterium*).

În general, nu toate bacteriile pot fi încadrate în tipurile de bază prezentate, ca, de exemplu, micoplasmele care nu posedă perete celular, motiv pentru care variază ca formă şi mărime, în aceeaşi categorie intrând şi ricketiile (paraziţi celulari). În plus, multe bacterii pot să-şi schimbe forma prin schimbarea condiţiilor externe (formele L) sau să prezinte forme de tranziţie. Aceste schimbări sunt cunoscute sub denumirea de *pleomorfism*.

Formele vegetative ale bacteriilor mai pot fi clasificate ca: organisme unicelulare şi multicelulare.

Organismele unicelulare pot fi sub următoarele forme: coci, bastonaşe, polimorfe; de asemenea pot forma *asocieri celulare* (coenobia): aglomerare a unor indivizi independenţi fiziologic care formează grupe ordonate sau neordonate, ca urmare a diviziunii celulare.

Organismele multicelulare sunt reprezentante de aglomerări de celule ce nu pot exista timp îndelungat independente fiziologic. În cazul procariotelor, aici sunt incluse formele producătoare de miceliu. Termenul de miceliu a fost preluat de la fungi, deoarece bacteriile formatoare de miceliu au fost incluse inițial printre acestea. Desigur, în cazul procariotelor nu putem vorbi de miceliu în adevăratul sens al cuvântului. Aceasta decurge și din faptul că în cadrul actinomicetelor există posibilitatea formelor de tranziție dintre agregatele de celule și organismele multicelulare, formatoare de miceliu. În acest caz, bacteriile se prezintă în forme filamentoase, care pot fi neramificate sau ramificate.

Dispunerea filamentelor poate fi:

– liberă și mobilă (*Beggiatoa*): ;

– sub formă de panglici (*Thiotrix*): ;

– dreaptă (*Beggiatoa*): ;

– lipită spiralat: ;

– formă gigant: .

În cazul actinomicetelor se observă o evoluție de la forme predominant unicelulare, ca *Mycobacterium* cu diviziune binară, la *Nocardia* și *Actinomycetes*, cu miceliu fragmentat, și *Streptomyces* cu formațiuni conidiale.

Mobilitatea bacteriilor se realizează fie prin alunecare fie cu ajutorul flagelilor care pot fi aranjați diferit astfel:

– monopolar - monotrich, un singur flagel inserat la un pol ("vibrio"): ;

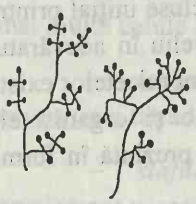
– monopolar - politrich sau lofotrich, reprezentați de un mănunchi de flageli inserați la un pol (*Thiospirillum*): ;

– dispunere bipolară (politrich sau amfitrichi) în mănunchi de flageli: ;

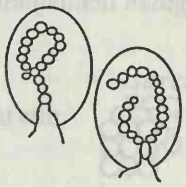
– peritrichi – flageli inserați fie pe părțile laterale ale celulei, fie pe toată suprafața celulei: .

Multiplicarea bacteriilor. Are loc asexuat, prin transmiterea informației genetice sau prin recombinarea materialului genetic. Multiplicarea asexuată se realizează prin: fisiune binară și endospori.

Fisiunea binară are loc perpendicular pe axa longitudinală şi prin scindare (diviziune). În cel de-al doilea caz, funcţie de natura exogenă sau endogenă a sporilor se deosebesc:



– *conidiospori.* Conidiile sunt unităţi de multiplicare vegetative exogene formate în mod obişnuit pe sporofori specifici, denumire incorectă după Zarnea care-i clasifică drept artrospori;



– *sporangiofori*, spori flagelaţi sau neflagelaţi, de origine endogenă în sporangiu;

Endosporii sunt forme rezistente la căldură înaltă, având peretele sporal format din multe straturi. Sunt de origine endogenă.

Multiplicarea prin recombinarea materialului genetic înlocuieşte multiplicarea sexuată şi se realizează prin:

– conjugare, care presupune asocierea celulelor şi transferul unidirecţional al materialului genetic printr-un tub proteic (exemplu factor F la *E. coli*);

– transformarea - încorporarea ADN-ului liber de către celula bacteriană;

– transducţie – transferul materialului genetic de la bacterie la bacterie cu ajutorul bacteriofagului ca vector.

Organizarea materialului genetic. Cromozomul bacterian este reprezentat de ADN dublu catenar, circular închis.

Expresia de "cromozom" este incorectă în "stricto senso", această denumire fiind rezervată doar cromozomilor organizaţi diferenţial la eucariote. Se utilizează de asemenea termeni ca echivalent al nucleului şi nucleoid.

Plasmida este moleculă de ADN circulară, adiţională (lungimea 1–15μm).

Tipul de nutriţie la bacterii poate fi:

– autotrof, caz în care procurarea energiei se face fie cu ajutorul luminii (fotoautotrofie) fie al compuşilor anorganici (chemoautotrofie);

– heterotrof, caz în care procurarea energiei se face din compuşi organici.

După modul de procurare al energiei se deosebesc bacterii:

– aerobe, care necesită oxigen (respiraţie) ca acceptor de electron;

– anaerobe sau tipul fermentativ – procese în care reacţiile chimice producătoare de energie necesită prezenţa unor compuşi organici ca acceptori finali de electroni.

Bacteriile importante în biotehnologie *Tabelul 2. 2*

Familia	Genuri implicate în biotehnologie	Grup – Familia	Genuri implicate în biotehnologie
Bacteriile aerobe Gram-negative *Pseudomonadaceae* *Methylmonadaceae* *Azotobacteriaceae*	*Pseudomonas* asimilarea hidrocarburilor SCP (single cell protein) oxidarea steroizilor, oxidarea O_2 *Acetobacter,* oxidarea alcoolilor Etanol – acid acetic Sorbitol – sorboză *Methylomonas, Methilococcus*: oxidarea metanului şi metanolului *Azotobacter:* fixarea nesimbiotică a azotului	Bacterii formatoare de endospori. *Bacillaceae* *Bacterii nesporulate* Gram-pozitive *Lactobacillaceae*	*Bacillus:* producerea de antibiotice (de natură polipeptidică), enzime *Clostridium*: producerea de butanol, acetonă, acid butiric *Lactobacillus*: formarea de acid lactic şi produse lactate, silozuri, alimente pe bază de acid lactic, alimente degradate
Bacterii facultativ anaerobe Gram-negative *Enterobacteriaceae*	*Escherichia şi Aerobacter:* formarea nucleotidelor şi a acidului 2-ceto glutaric	*Actinomycetes* şi microorganisme înrudite corineforme	*Corynebacterium şi Arthrobacter*: oxidarea glucidelor cu formarea aminoacizilor *Cellulomonas* – degradarea celulozei
Bacterii chemolitotrofe Gram-negative	*Thiobacillus:* flotare cupru, zinc, fier, mangan	*Propionibacteriaceae* *Mycobacteriaceae*	*Propionibacterium*: obţinerea vitaminei B_{12} şi acid propionic *Microbacterium*: oxidarea glucidelor, a steroizilor
Bacterii formatoare de metanol *Methanobacteriaceae* Coci Gram-pozitivi *Micrococaceae* *Streptococaceae*	*Methanobacterium, Methanosarcina, Methanococcus:* formarea de metan în turnurile de digestie, în tratamentul apelor reziduale *Micrococcus:* oxidarea glucidelor şi steroizilor *Streptococcus*: formarea acidului lactic şi diacetil *Leuconostoc* – formarea dextranului	*Nocardiaceae* *Streptomycetaceae*	*Nocardia* – oxidarea glucidelor şi steroizilor *Streptomyces* – formarea de diverse antibiotice şi a vitaminei B_{12}

Modul de viaţă al bacteriilor poate fi:

- saprofit, bacteriile folosind pentru nutriţie material organic mort;
- parazit, nutriţie din material organic viu;
- simbiont. În acest ultim caz transmiterea nutrienţilor se face în lanţ, produsul final al unei specii fiind folosit ca nutrient de o altă specie ş.a.m.d.

Cu excepţia actinomicetelor, toate bacteriile importante din punct de vedere biotehnologic (tabelul 2.2) aparţin ordinului *Eubacteriales*.

2.1.2. Drojdiile

Drojdiile şi fungii fac parte din grupa mare a ciupercilor.

Caracterele şi clasificarea drojdiilor. Drojdiile reprezintă o ramură minoră a ciupercilor sub raportul numărului de specii, dar de o importanţă majoră în ceea ce priveşte activitatea biochimică. Unele dintre ele realizează fermentaţii cunoscute încă din antichitate, ca producerea vinului şi a berii.

Drojdiile sunt eucariote saprofite, se găsesc răspândite pe fructe, pe nectarul florilor, libere în sol şi în tubul digestiv al animalelor şi insectelor.

Drojdiile nu formează un grup sistematic omogen, fiind răspândite în cele trei grupe majore ale ciupercilor superioare. Caracteristica lor generală se referă la forma unicelulară permanentă sau predominantă şi la absenţa unui miceliu veritabil cenocitic.

Identificarea şi clasificarea drojdiilor se face după următoarele criterii: forma şi mărimea celulelor, modul de reproducere, formarea mugurilor şi a pseudomiceliului, existenţa sporulării etc.

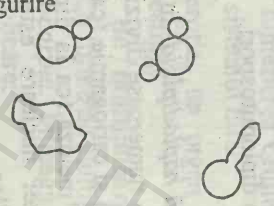
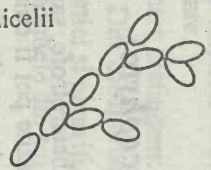
Drojdiile care se multiplică sexuat sunt sporogene. Formele ascosporogene incluse în *Ascomycetes* formează ascospori în asce. Balistosporogenele, incluse în *Basidiomycetes*, formează balistospori.

Drojdiile asporogene nu au reproducere sexuată şi sunt incluse la Fungi imperfecţi.

Principalele grupe de drojdii şi caracteristicile lor sunt cuprinse în tabelul 2.3.

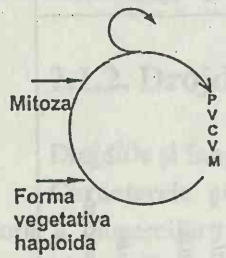
Tabelul 2.3

Clasificarea drojdiilor

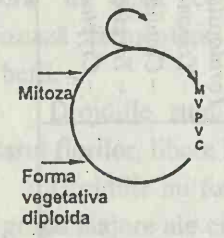
Structuri vegetative	Multiplicare asexuată	Genuri	Multiplicare sexuată
Celule vegetative izolate rotunde, ovoide sau alungite în hife rudimentare	Fisiune transversală Înmugurire 	*Hemiascomycetes* *Endomycetales* – *Schizosaccharomyces* – *Saccharomyces* – *Hansenula* – *alte genuri*	Asce conținând ascospori. Ascospori cu forme diferite: – sferice – reniforme – seceră – pălărie cu inel bazal sau ecuatorial
Celule izolate Pseudomicelii 	Înmugurire	*Sporabolomycetales* – *Sporobolomyces* – *Rhodosporidum* – *Leucosporidum*	Formarea sporilor în excrescențe celulare (sterigme). Eliberarea brutală a sporilor în aer. – balistospori (nu se observă fază sexuată) – basidiospori
Celule izolate Pseudomicelii	Înmugurire	*Torulopsidales* – *Trigonopsis* – *Candida* – *Torulopsis* – *Cryptococcus*	Nu formează ascospori sau balistospori

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ciclul de viață sexuat. În concordanță cu modul de multiplicare sexuat, ciclul de viață începe cu zigotul care se formează prin plasmogamie (fuziunea gameților – *P*), cariogamie (fuziunea nucleilor – *C*) și se încheie cu formarea de gameți (*G*) imediat după meioză (*M*) sau ceva mai târziu. Aceste faze nucleare alternative nu sunt direct legate unele de altele, putând fi alternate de diviziuni mitotice care în majoritatea cazurilor conduc la forme vegetative. Diferitele cicluri de viață sunt clasificate după cum mitozele au loc în faze haploide, diploide sau ambele faze.



• *Ciclul de viață haploid.* În ciclul de viață haploid forma vegetativă este haploidă, deoarece meioză apare imediat după cariogamie. Faza diploidă se limitează numai la zigot. Multiplicarea vegetativă este posibilă prin haplomitospori.



• *Ciclul de viață diploid.* În ciclul de viață diploid forma vegetativă e diploidă deoarece o serie de diviziuni mitotice au loc între cariogamie și meioză (M). Faza haploidă există numai la gameți. Forma vegetativă (reproducere asexuată) este posibilă numai prin diplomitospori.

• *Ciclul de viață haplodiploid.* În ciclul de viață haplodiploid au loc numeroase diviziuni mitotice și anume între meioză și cariogamie (ca la haploizi) și între cariogamie și meioză (ca la diploid). În acest caz alternarea fazei nucleare este legată de o alternare a generațiilor.

Ciclurile de viață amintite anterior sunt caracteristice atât pentru drojdii, cât și pentru fungi.

2.1.3. Fungii (*Mycophyta*)

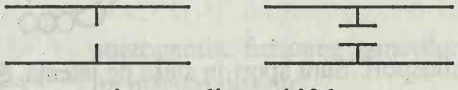
Fungii sunt eucariote, heterotrofe, saprofite sau parazite în apele dulci sau în sol. Saprofitele și unele parazite pot fi cultivate în condiții de laborator. Printre fungi se găsesc toate formele de tranziție de la organisme unicelulare mobile la multicelulare, dar cu tal coenocitic de structură complexă. Nu formează țesuturi adevărate. Cu excepția unor fungi care nu au perete celular, peretele lor conține

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

chitină, iar un grup restrâns conţine celuloză. Celulele sunt de tip eucariot, conţin mai mulţi nuclei, nu conţin plasmide.

Forme vegetative. Formele vegetative se prezintă ca:

– plasmodiu, un tal ameboidal fără perete celular (*Myxomicetes*);

– hife, care au structură filamentoasă ramificată, fie neseptată (*Phycomycetes*), fie septată (*Ascomycetes, Basidiomycetes*). Septul este în general perforat anular sau doliporic:  ;

– miceliu, care reprezintă totalitatea hifelor;

– heterocarion, un miceliu conţinând nuclei diferiţi din punct de vedere genetic;

– dicarion, o formă specială de heterocarion, conţinând numai doi nuclei diferiţi / celulă, ceea ce le permit să se dividă prin conjugare;

– monocarion, o formă specială de homocarion, la care fiecare celulă conţine numai un nucleu;

– celule înmugurite sferice sau elipsoidale, rezultatul multiplicării vegetative. Mugurii se desprind de pe celula-mamă. În cazul înmuguririi miceliului, celulele-mugur-"fiice" formează o asociaţie de celule;

– plehtenchim, un ţesut "neadevărat". Coeziunea în aşa-zisul ţesut se realizează prin tumefierea celulelor cu formarea unui gel insolubil în apă, care cuprinde întreg sistemul hifal;

– scleroţia, un organ plehtenchimal multicelular, fiind o formă de supravieţuire (resting).

Forme de multiplicare. Transmiterea informaţiilor genetice fără recombinare. Ca forme de multiplicare deosebim:

– *holocarpul.* Întreaga celulă vegetativă este transformată într-un dispozitiv de multiplicare;

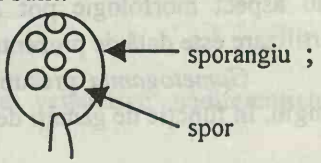
– *eucarpul.* O parte din tal (miceliu) formează dispozitivul de multiplicare, în timp ce restul celulelor îşi continuă activitatea vegetativă.

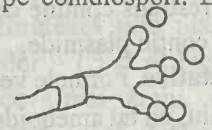
Formele auxiliare de multiplicare se folosesc pentru multiplicarea vegetativă; nu are loc alternarea fazelor nucleare.

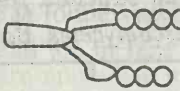
Ca forme auxiliare de multiplicare distingem:

– *planosporii* sau *zoosporii.* Din zoosporangiu se formează unul sau doi flageli. Sunt caracteristici la fungii acvatici şi paraziţi.

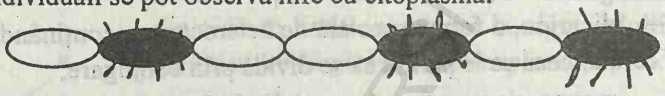
– *aplanosporii*, care apar la formele din sol şi sunt:

– endospori, se formează în sporangiu; 

– exospori, care se formează pe conidiospori. Exosporii sunt mici, iar conidiosporii sunt tipici:  ;

– didiospori. Sunt sferici sau alungiți și se formează prin desprindere (rupere) din hifele septate:  ;

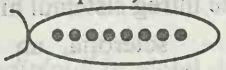
– clamidiospori. Sunt spori în stare de latență. Sunt dispuși terminali sau în interiorul hifei, se formează din unul sau două sau mai multe septe după contracția protoplasmei, de aceea între clamidiosporii individuali se pot observa hife cu citoplasmă:



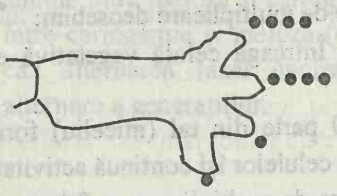
Forme principale de fructificare. Se folosesc pentru multiplicarea sexuată. Are loc alternarea fazelor nucleare.

La fungii imperfecți, organele de latență (sporii) apar din zigot, care, de obicei, germinează după meioză, pentru a forma sporangiu.

La fungii superiori, nu se formează, de regulă, spori. Nucleul zigotului se divide meiotic și se formează un meiosporangiu. Deosebim:

– asc – sporangiu sub formă de teacă, în care meiosporii, de obicei 8, sunt formațiuni libere. Caracteristici pentru *Ascomycetes*: 

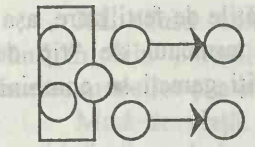
– basidii – sporangiu sub formă de măciucă, din care s-au segmentat prin meioză, de obicei, 4 meiospori:



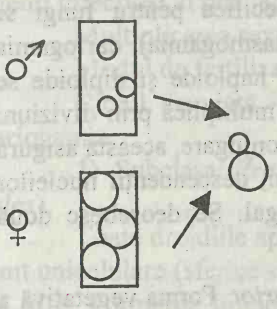
– hymenium – sporangiu răspândit pe suprafața miceliului și străbătut de hife sterile (parahife). Sporangiul se formează neregulat sub formă de *hymenium* sau organe de fructificare pleptenchimale (ascocarpi sau basidiocarpi).

Modul de fertilizare. Fertilizarea în sensul strict al cuvântului este o cariogamie. Are loc după fuziunea (plasmogamia) elementelor de multiplicare, care sub aspect morfologic pot diferi considerabil. Marea varietate a modului de fertilizare este dată de prezentarea lor în continuare.

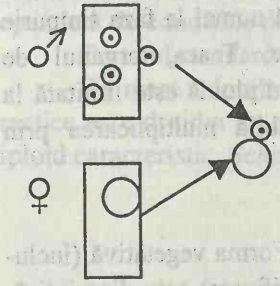
Gametogamia presupune fuziunea gameților individuali formați în sporangiu. În funcție de gameți deosebim:



– izogamia: fuziunea gameţilor de aceiaşi formă şi mărime;

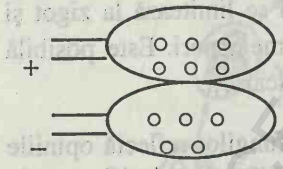


– anizogamia: fuziunea gameţilor de aceiaşi formă, dar de mărimi diferite;



– oogamia: fuziunea gameţilor de formă şi mărime diferită.

Gametangiogamia presupune fuziunea gametangiilor (organ purtător de gameţi). Prin analogie cu gametogamia distingem:

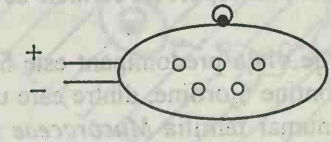


– izogametangiogamia;

– anizogametangiogamia;

– oogametangiogamia.

Gametogametangiogamie este fuziunea dintre gamet şi gametangiu:



Somatogamia este fuziunea dintre celulele vegetative nediferenţiate, dar + şi – .

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Deoarece există limitări în ceea ce privește modalitățile de fertilizare, așa-numitele incompatibilități de împerechere, s-a introdus termenul de "tip de împerechere", înțelegându-se prin aceasta că numai anumiți gameți se combină între ei. Gameții au fost notați cu simbolul + și – sau *a* și α.

Ciclul de viață sexuat. Ciclurile de viață specifice pentru fungi se caracterizează prin aceea că, după fuziunea gameților (plasmogamia), cariogamia (fuziunea nucleilor) nu are loc imediat, iar între fazele haploide și diploide se inserează o așa-numită fază dicariotică în care nucleii se multiplică prin diviziuni mitotice. Deoarece aceste diviziuni nucleare au formă de conjugare, aceasta asigură faptul că, la sfârșitul fazei dicariotice a formării zigotului, descendenții nucleilor celor doi gameți sunt prezenți în număr aproximativ egal. Se deosebesc două cicluri.

Ciclul de viață haplodicariot. Forma vegetativă a haplodicariofazei este limitată numai la faza timpurie a organelor de fructificare. Teaca, organul de fructificare e haploidă. Faza diploidă este limitată la nucleul zigotului. Este posibilă multiplicarea prin haplomitospori.

Ciclul de viață dicariot. Forma vegetativă (incluzând teaca organelor de fructificare) este dicariotică, deoarece imediat după formarea haplomeiosporilor aceștia sau celulele rezultate sunt supuse fuziunii (somatogamia). Faza diploidă se limitează la zigot și faza haploidă, în general, la meiospori. Este posibilă multiplicarea prin mitospori dicarioți.

Clasificarea fungilor. Clasificarea taxonomică a fungilor reflectă opiniile subiective ale sistematicienilor. Din punct de vedere pragmatic, clasificarea în 4 clase principale și ordine reflectă cel mai bine distribuirea reprezentanților importanți biotehnologic.

I. *Clasa Myxomycetes* – nu prezintă interes în biotehnologie.

II. *Clasa Phycomycetes.* Sunt microorganisme unicelulare, cu miceliul organizat macroscopic, cu pereți transversali evidenți numai în timpul multiplicării.

Multiplicare asexuată se face prin planospori (la formele acvatice) sau prin aplanospori (la formele din sol).

Multiplicarea sexuată – ciclul de viață predominant este haploid, dar, de asemenea, și diploid și haplodiploid. Conține 6 ordine, dintre care ultimul, ordinul *Zygomycetales*, conține 3 familii, dar numai familia *Mucoraceae* (30 de genuri) este importantă din punct de vedere tehnologic.

Rhizopus nigricans este cel mai vechi fung folosit pentru producția biotehnologică a acidului citric.

III. *Clasa Ascomycetes.* Fungii din această clasă sunt purtători de asci, având miceliu puternic ramificat, cu pereţi transversali perforaţi care permit trecerea nucleilor şi a altor organe.

Mod de viaţă: saprofit, conţinând multe specii coprofite sau paraziţi şi agenţi infecţioşi ai plantelor.

Multiplicarea sexuată prin ascospori.

Modul de fertilizare: gametogamie sau gametogametangiogamie.

Ciclul de viaţă – faza dicariotică are loc adesea între faza haploidă şi cariogamie.

1) Subclasa: *Protoascomycetidae*, ordinul *Endomycetales* (*Saccharomycetales*).

Toate drojdiile aparţin acestui taxon. Deşi în majoritatea cazurilor drojdiile sunt unicelulare (sferice sau elipsoidale), celulele pot agrega în forme producătoare de hife. Formarea hifelor reprezintă un caracter de specie, dar este tranzitoriu, dependent de condiţiile de mediu.

Tratatul standard pentru taxonomie este Lodder.

De mare importanţă atât în cercetarea fundamentală cât şi pentru scopuri practice este drojdia de panificaţie sau bere – *Saccharomyces cerevisiae*. Este un diploid caracteristic. *Schizosaccharomyces* pombe este tipic haploid (fig.2.3)

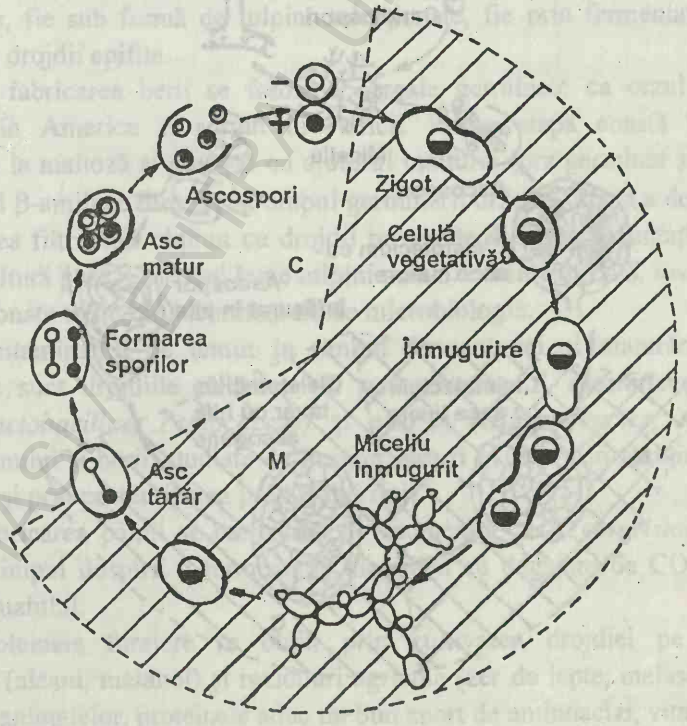
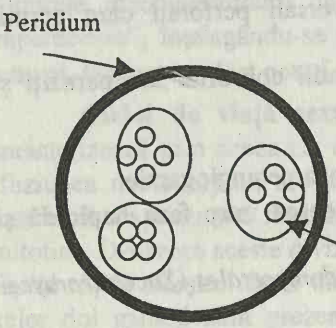


Fig.2.3. Ciclul de viaţă la *Sacharomyces cerevisiae.*

2) Subclasa: *Plectomycetides.*



Cleistotecium – organ de fructificare închis dintr-un corp sferic: sporii sunt eliberați numai după spargerea peretelui corpului (peridium).

În ordinul *Plectascales* intră microorganismele clasice pentru industria fermentativă și anume: reprezentanți din gen. *Penicillium, Aspergillus* și *Cephalosporium*, care sunt în prezent în atenția cercetătorilor și biotehnologilor.

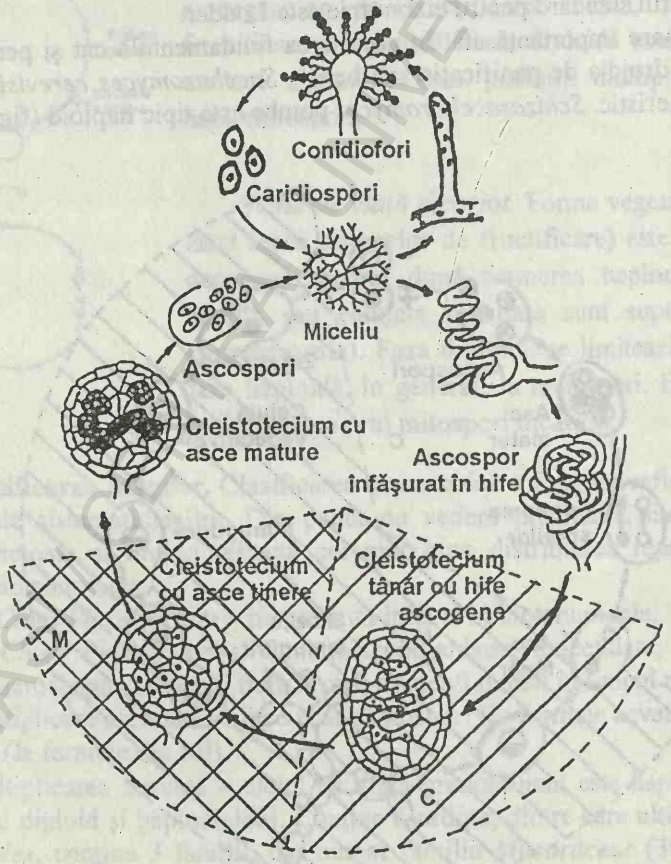


Fig. 2.4. Ciclul de viață la *Aspergillus repens.*

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Majoritatea speciilor celor trei genuri sunt fungi imperfecți, dar sunt plasați la fungi perfecți datorită conidioforilor tipici. *Aspergillus repens* servește ca formă de referință (fig. 2.4).

IV. *Clasa Basidiomycetes* nu conține forme importante pentru biotehnologie.

Clasa fungi imperfecți (*Deuteromyces*) și-au pierdut capacitatea de reproducere sexuată. În acest taxon intră fungi importanți pentru biotehnologie, ca *Aspergillus, Penicillium* și *Cephalosporium*, care pot fi trecuți și la fungi perfecți (cum s-a făcut de altfel) pe baza unor caracteristici morfologice.

2.1.4. Rolul și utilizarea microorganismelor în biotehnologii

Din timpuri imemoriale omul a folosit microorganismele pentru prepararea băuturilor, alimentelor și îmbrăcămintei, deși existența acestora nu a fost recunoscută și studiată decât începând cu secolul al XIX-lea.

Drojdiile. *Saccharomyces cerevisiae* este specia principală folosită de om pentru producerea alcoolului etilic și a dioxidului de carbon prin fermentație.

Pentru obținerea vinului se folosesc specii de *S. cerevisiae*, var. *ellipsoideus*, fie sub formă de tulpini selecționate, fie prin fermentație spontană realizată cu drojdii epifite.

La fabricarea berii se folosesc cereale germinate ca orzul în Europa, porumbul în America și sorgul în Africa. Prima etapă constă în hidroliza amidonului la maltoză și glucoză cu ajutorul malțului (orz germinat și uscat) care conține α și β-amilaze formate în timpul germinării orzului. Etapa a doua constă în însămânțarea filtratului obținut cu drojdii provenite dintr-o fermentație anterioară sau cu o cultură pură. Cele mai bune tulpini sunt *S. cereivisiae* și *S. uvarum* care au fost selecționate treptat în laboratoarele de microbiologie.

Contaminanții de temut în timpul fermentației și maturării sau după îmbuteliere sunt drojdiile sălbatice (*S. pasteurianus, S. diastaticus*), bacteriile lactice (*Lactobacillus, Pediococcus)* și acetice (*Gluconobacter, Acetobacter*). "Bolile" vinului și berii, studiate de Pasteur, pot fi evitate prin menținerea igienei industriale și prin pasteurizarea produsului finit.

Fabricarea pâinii se realizează de asemenea cu *S. cerevisiae*, care efectuează în timpul dospirii o fermentație alcoolică cu degajare de CO_2 ce permite afânarea aluatului.

Proteinele furajere se obțin prin cultivarea drojdiei pe subproduse industriale (alcani, metanol) și reziduuri agricole (zer de lapte, melasă). Adăugate în furajele animalelor, proteinele aduc un bun aport de aminoacizi, vitamine și acizi nucleici.

Fungii. Ca şi drojdiile, fungii sunt folosiţi de om pentru prepararea alimentelor. Descoperirea antibioticelor şi, în particular, a penicilinei a revoluţionat, după cel de-al doilea război mondial, terapeutica medicală permiţând combaterea unor infecţii redutabile, salvând astfel milioane de vieţi omeneşti.

Fungii sunt folosiţi în fabricarea produselor alimentare.

În industria brânzeturilor au un rol primordial în înmuierea şi aromatizarea pastei, folosindu-se tulpinile: *Penicillium roquefortii* (brânză cu pastă verde), *Penicillium camembertii* şi *Geotrichium candidum* (pastă presată).

În industria salamurilor folosirea unui strat alb de *Penicillium nalgiovense* pe suprafaţa salamurilor previne dezvoltarea microorganismelor care degradează produsul.

În Extremul-Orient băuturile alcoolice de tip sake japonez sunt fabricate cu ajutorul fungilor. Hidroliza amidonului din orez care precede fermentaţia se realizează cu amilaze biosintetizate de *Aspergillus oryzae.*

Industria chimică şi farmaceutică produce prin biosinteză:

– enzime: proteaze, pectinaze, amilaze cu tulpini din genul *Aspergillus;*

– acizi organici: acid citric cu *Aspergillus niger*;

– antibiotice: penicilina cu tulpina *Penicillium chrysogenum*, cefalosporinele cu tulpini din genul *Cephalosporium;*

– hormoni-cortizoni;

– biomasă în scopul obţinerii unei surse complementare de proteine pentru furajarea animalelor. Pentru aceasta se folosesc subproduse ale industriei alimentare şi reziduuri agricole: zer, melasa de la fabricarea zahărului din sfeclă de zahăr, drojdia de la distilării, paiele etc.;

– multe specii saprofite, care se dezvoltă pe resturile organice animale şi vegetale desăvârşind astfel marele ciclu biologic natural.

Bacteriile. ***Bacteriile acetice*** (*Gluconobacter, Acetobacter*) sunt folosite la fabricarea tradiţională a oţetului din vin, cidru, cartofi. Ele sunt strict aerobe. Oxidează, de asemenea, sorbitolul în sorboză, care e utilizată apoi în sinteza viteminei C.

Bacteriile lactice (*Lactobacillus, Lactocccus, Strptococcus*) fermentează produsele lactate (iaurt, brânză dulce). Bacteriile lactice sunt prezente în mod obişnuit în lapte, transformând lactoza în acid lactic, acidifiind laptele, provocând astfel o acrire spontană. La folosirea brânzeturilor ele participă atât la formarea cheagului, cât şi la maturarea lui.

La fabricarea untului din smântână, *Lactococcus diacetylactis* produce diacetil care conferă gust şi aromă specifice untului.

Fermentaţia lactică a produselor vegetale conservă şi îmbunătăţeşte calităţile nutritive ale furajelor însilozate şi a murăturilor folosite în gospodăriile individuale.

Acidul lactic este produs pe scară industrială fiind folosit în scopuri farmaceutice.

Bacteriile butirice (*Clostridium butyricum*). Sunt bacterii sporulate, strict anaerobe, aparţinând genului *Clostridium*. Intervin în înmuierea inului şi a cânepii. Prin atacarea pectinelor eliberează fibrele textile.

Producerea industrială a acetonei şi butanolului se realiează cu *Clostridium acetobutylicum* prin fermentarea unor glucide.

Genul *Bacillus* reprezintă un grup de microorganisme Gram-pozitive sporulate, aerobe.

Unii reprezentanţi ai genului ca *Bacillus thuringiensis* produc substanţe toxice. Bacilii produc în timpul sporulării o proteină care formează o incluziune cristalină vizibilă la microscop. Această proteină este toxică pentru larve. Bacillii cultivaţi în bioreactoare sunt recoltaţi după începutul sporulării, sunt uscaţi şi încorporaţi într-o pudră de protecţie pentru arbori fructiferi.

Unii reprezentanţi ai genului *Bacillus* sunt utilizaţi pentru producerea enzimelor ca:

– proteaze termostabile pentru industria detergenţilor (*B.thermoprotheolyticus*);

– α-amilaze, care convertesc amidonul în glucoză (*B. stearothermophilus*);

– glucozizomeraza, care permite conversia glucozei (amidonul de porumb) în fructoză cu putere edulcorantă mai puternică, folosită în industria băuturilor nealcoolice (*B. coagulans*).

Actinomicetele produc substanţe antibiotice folosite în combaterea maladiilor infecţioase. Speciile producătoare de antibiotice aparţin mai ales genului *Streptomyces.*

Bacteriile din genul *Corynebacterium şi Brevibacterium* şi mutantele derivate din aceste microorganisme produc aminoacizi: acid L-glutamic, L-lizina şi L-triptofan.

Bacteriile metilotrofe cultivate pe metan sau metanol constituie o sursă de proteine pentru zootehnie.

Propionibacterium se utilizează la producerea de vitamină B_{12} .

Bacteriile termofile metanogene sunt utilizate pentru digestia anaerobă a efluenţilor industriali, a unor reziduuri agricole şi menajere în staţiile de epurare.

2.2. TAXONOMIA ŞI NOMENCLATURA

Prin taxonomie se înţelege ştiinţa clasificării şi cuprinde două discipline majore: indentificarea şi nomenclatura. Trebuie subliniată diferenţa dintre taxonomia bacteriană şi filogenia bacteriană. Taxonomia bacteriană se bazează pe analize fenotipice convenţionale de clasificare. Deoarece bacteriile sunt forme de viaţă mici şi prezintă relativ puţine structuri cheie referitoare la rădăcinile lor, relaţiile filogenetice ale procariotelor pot fi induse doar din analize genotipice. Analizele fenotipice joacă un rol tradiţional important în identificarea şi clasificarea bacteriilor, în special când aceasta are drept scop final diagnosticul clinic microbiologic. Chiar şi în domeniul diagnosticului microbiologic în care metodele microbiologice convenţionale se folosesc de mai multe decenii, au început să fie aplicate metodele genotipice datorită sensibilităţii, rapidităţii şi specifităţii acestor metode de identificare.

Recent s-a introdus conceptul de taxonomie polifazică, care reuneşte integrativ şi unitar informaţii fenotipice, genotipice şi filogenetice.

Taxonomia cuprinde:

– clasificarea microorganismelor ce presupune aranjarea ordonată în grupe taxonomice pe baza similitudinii;

– nomenclatura, care presupune atribuirea de nume unităţilor taxonomice;

– identificarea de organisme necunoscute, în scopul ordonării în grupe taxonomice şi atribuirea de nume.

2.2.1. Clasificarea şi conceptul de specie

Deoarece microbiologii trebuie să identifice şi să clasifice bacteriile în scopuri practice, taxonomia rămâne în continuare o disciplină importantă. În microbiologie unitatea taxonomică de bază este specia.

Specia microbiană este o concepţie taxonomică şi nu o entitate definită cu precizie.

La microorganisme nu există specii adevărate (ca la plante şi animale cu reproducere biparentală) unde fenomenele de sexualitate joacă un rol fundamental, ci numai o reproducere clonală. Din această cauză la microorganisme există clone, ale căror proprietăţi globale rămân constante atât timp cât condiţiile de cultivare nu variază şi sunt cunoscute în laborator sub denumirea de "tulpini microbiene".

Clona reprezintă o populaţie de celule identice din punct de vedere genetic derivate dintr-o singură celulă.

Codul de nomenclatură a Comitetului Internaţional de Nomenclatură a fixat următoarele reguli:

– fiecare fel distinct de bacterie este numit specie;

– fiecare specie distinctă primeşte după regulile stabilite de Linne' un nume format din două cuvinte latineşti. Exemplu: *Bacillus subtilis*;

– primul cuvânt este numele genului şi este totdeauna un cuvânt latin sau grec latinizat, fiind scris totdeauna cu literă mare;

– al doilea cuvânt este un epitet specific, care nu este scris niciodată cu majusculă.

Genul este un grup constituit din specii înrudite.

Familia cuprinde un grup de genuri diferite. Numele unei familii este format din numele unuia din genurile pe care le cuprinde, la care se adaugă sufixul "aceae". Exemplu: genul *Bacillus*, familia *Bacilaceae.*

Ordinul reprezintă un grup de familii înrudite. Numele unui ordin este format prin înlocuirea sufixului "aceae", al unei familii componente cu sufixul "ales". Exemplu: *Bacillales.*

Clasa este un grup de ordine înrudite.

Bacteriile fac parte din clasa *Schizomycetes* care cuprinde 10 ordine. Trebuie subliniat faptul că, datorită studiilor recente şi permanente referitoare la taxonomia microbiană, apar constant modificări în ceea ce priveşte încadrarea taxonomică a microorganismelor deja cunoscute.

2.2.2. Taxonomia bacteriană convenţională

Caracteristicile cu valoare taxonomică includ: morfologia, coloraţia Gram, tipul de nutriţie (fototrof, chemoorganotrof, chemolitotrof), compoziţia peretelui celular, prezenţa incluziunilor celulare şi a produşilor de rezervă, capsula, pigmenţii, necesităţi nutriţionale, folosirea sursei de carbon, azot şi sulf, produşii de fermentaţie, temperatura şi *p*H-ul (toleranţa), sensibilitatea la antibiotice, patogenitatea, relaţii simbiotice, caracteristici simbiotice, caracteristici imunologice şi habitat.

Coloraţia Gram reprezintă o caracteristică diferenţială utilă. În taxonomia tradiţională, bacteriile sunt grupate ca bacterii Gram-pozitive, coci Gram-negativi, bacterii Gram-negative ş.a.m.d. Coloraţia Gram pare a fi o proprietate de importanţă fundamentală atât pentru clasificarea filogenetică a bacteriilor cât şi pentru taxonomie şi reprezintă primul test folosit pentru clasificarea noilor izolate. De asemenea, morfologia şi structurile speciale ale celulelor, ca de exemplu sporii, sunt folosite drept criterii de clasificare. De exemplu, endosporii bacterieni reprezintă o structură caracteristică unică şi de o importanţă practică deosebită, motiv pentru care toate bacteriile formatoare de endospori sunt clasificate atât taxonomic cât şi filogenetic în aceeaşi grupă.

Este cunoscut faptul că morfologia celulară nu reprezintă un criteriu de bază pentru relaţiile filogenetice şi trebuie folosit cu precauţie doar ca indicator general privind încadrarea taxonomică sau filogenetică.

2.2.3. Chemotaxonomia

În chemotaxonomie se folosesc diverse specii moleculare cu valoare taxonomică ca: proteine, enzime, peptidoglicani, membrană citoplasmatică şi produşi de metabolism.

Analiza proteinelor. Proteinele sunt molecule înalt conservate în timpul evoluţiei, în special cele necesare pentru fiziologia bacteriană : enzime, feredoxine, citocromi. Citocromii sunt hemoproteine transportoare de electroni. Sunt clasificaţi în patru clase, în funcţie de natura grupărilor prostetice.

Pentru studiul acestora se folosesc două tehnici: dozare sptectrofotometrică pentru citocrom, iar pentru secvenţele primare (aminoacizi) sau terţiare, difracţia cu raze X. Această tehnică s-a folosit pentru evidenţierea similarităţii dintre unele bacterii fotosintetizante (*Rhodopseudomonas capsulatus*), bacteriile nesulfuroase aerobe (*Paracoccus denitrificans*) şi mitocondria de la organismele eucariote. Studiile efectuate ar putea conduce la concluzia că *P. denitrificans* derivă din *R..capsulatus* prin pierderea capacităţii de fotosinteză şi că aceste bacterii sunt înrudite cu endosimbionţii care stau la baza mitocondriilor.

Profil electroforetic. Se cunoaşte faptul că proteinele datorită încărcăturii electrice pot migra când sunt puse într-un câmp electric. Metoda folosită în mod obişnuit în taxonomia microbiană constă în fixarea extractelor proteice pe geluri de poliacrilamidă. În acest scop celula va fi ruptă prin sonicare, având loc concomitent dislocarea subunităţilor polipeptidice libere cu ajutorul SDS. În continuare, amestecul de proteine este denaturat prin încălzire la 100°C cu un exces de SDS şi 2-mercaptoetanol care rupe legăturile protein disulfidice. În aceste condiţii, polipeptidele leagă o cantitate constantă de SDS – aproximativ 1,4 g SDS/g de polipeptidă. Încărcătura polipeptidei devine nesemnificativă, comparativ cu încărcătura negativă purtată de SDS. Migrarea în gelul de poliacrilamidă depide doar de mărimea polipeptidelor. Tehnica permite atât analiza compoziţiei amestecului polipeptidic cât şi determinarea masei moleculare a acestora comparativ cu markerii de masă moleculară cunoscută.

S-a demonstrat experimental că există o reacţie lineară între $\log_{10}$ a masei moleculare a peptidei şi mobilitatea ei relativă (R_f)care este apreciată prin distanţa de migrare în gel. Studii comparative au arătat că rezultatele sunt în concordanţă cu cele obţinute prin hibridizarea ADN/ADN.

Enzimele. În locul studierii tuturor proteinelor celulare, este posibil studiul unor enzime (zimograma). Activitatea enzimatică este evidenţiată prin colorare în prezenţa unui substrat specific. Se aplică pentru evidenţierea esterazelor şi dehidrogenazelor. Se obţin aproximativ aceleaşi rezultate ca prin hibridizare ADN/ADN. Tehnica a fost propusă pentru identificarea bacteriilor.

Peptidoglicanii. Peptidoglicanul (mureina) este prezent la toate bacteriile, cu excepţia micoplasmelor şi archeobacteriilor. Este compus dintr-un schelet aminoglucidic la care se leagă un lanţ tetrapeptidic cu un diaminoacid în poziţia *3*. Aceste lanţuri sunt legate direct sau printr-o punte la unul sau şase aminoacizi. Scheletul aminoglucidic este constant, dar compoziţia lanţurilor tetrapeptidice şi a punţii este variabilă, în special la bacteriile Gram-pozitive incluzând actinomicetele şi lactobacilii. Peptidoglicanul este folosit în studiile taxonomice ale actinomicetelor. Frecvent studiată a fost structura peptidoglicanului (structura aminoacizilor) de tip *acil* a acidului muramic şi a compoziţiei glucidelor din peretele celular. Acidul diaminopimelic (ADP) a fost studiat prin cromatografie în strat subţire pe celuloza din hidrolizatul global, urmat de o colorare cu ninhidrină.

Tehnica permite separarea meso-ADP, hidroxi-ADP şi a stereoizomerilor LL-ADP şi DL-ADP. Tehnica s-a folosit şi la diferenţierea tulpinilor de *Bacillus*.

Membrana citoplasmatică. ***Quinonele*** sunt componente ale membranelor citoplasmatice. La bacterii s-au găsit două tipuri de quinone: ubiquinone şi menaquinone. Sunt importante în studiile taxonomice la bacterii Gram-pozitive, în special la actinomicete la care pot fi evidenţiate patru grupuri. Menaquinonele sunt notate MK-*n* (H*m*), unde *n* este numărul total de unităţi isoprene şi *m* numărul de unităţi isoprene saturate. Ele pot fi izolate din celule ca majoritatea lipidelor, prin extracţie în cloroform-etanol. Menaquinonele pot fi separate prin HPLC (Hhigh Performance Liquid Chromatography).

Determinarea fosfolipidelor. Fosfolipidele sunt componente ale membranei citoplasmatice la toate celulele vieţuitoarelor, cu excepţia *Archeobacteriilor* la care fosfolipidele sunt înlocuite cu glicerol-eter. Sunt extrase cu solvenţi organici şi separate prin cromatografie în strat subţire. Pe baza studiilor efectuate pe fosfolipide, actinomicetele pot fi separate în cinci grupuri.

Acizii graşi. Sunt cunoscute două clase de acizi graşi: liniari şi ramificaţi, ultimii fiind specifici pentru bacteriile Gram-pozitive. Ei pot fi separaţi de lipidele polare din membrana citoplasmică prin esterificare şi prin gaz cromatografie sau cromatografie în strat subţire. La actinomicete patternul acizilor graşi este în bună corelare cu filogenia acestui grup.

Membrana externă: acizii micolici. Acizii micolici sunt componentele principale ale membranei lipidice externe la *Mycobacterium, Corynebacterium* şi *Nocardia*. Ei pot fi diferenţiaţi după lungimea lanţului. Acizii micolici adevăraţi,

izolați din *Mycobacterium*, au lanțul format din 60–80 atomi de carbon, în timp ce acizii micolici identificați la *Nocardia* și *Corynebacterium* au acizi micolici cu 50 și 30 atomi de carbon. Aceste genuri pot fi separate după lungimea lanțurilor acizilor micolici sub formă de metil esteri, prin cromatografie în strat subțire pe silicagel.

Produșii finali ai metabolismului. Sunt evidențiați prin teste biochimice clasice, ca reacția Voges-Proskauer sau testul roșu de metil. Ei pot fi studiați cantitativ prin gaz-lichid cromatografie. Tehnicile putând fi computerizate sunt folositoare în studiile taxonomice în special la microorganisme anaerobe.

2.2.4. Taxonomia moleculară

ADN - cromozomal

Determinarea procentului molar în G + C. Studiile au demonstrat că, bazele azotate, purinele (G–guanină; A–adenină) și pirimidinele (C–citozina; T–timina) variază de la un organism la altul, dar conținutul acestora este constant în cadrul speciei.

Conținutul în *G+C* este dat de următoarea formulă:

$$\% \text{ mol } G + C = (G + C)\text{x}100\ (A + T + G + C)$$

și poate fi determinat prin metode directe și indirecte. Determinarea directă a % molar G+C se realizează prin tehnica HPLC și se bazează pe hidroliza ADN, cu obținerea unui amestec de nucleotide din care se determină procentul tuturor bazelor azotate.

Determinarea indirectă constă în aprecierea conținutului *G+C* prin determinarea "temperaturii de topire" – t_m a ADN-ului, fiind tehnica frecvent utilizată în studiile de taxonomie. t_m – melting midpoint – reprezintă temperatura în grade Celsius la care, dintr-o masă de molecule ADN, jumătate se găsesc în stare dublucatenară și jumătate în stare monocatenară (denaturate).

Denaturarea este denumită topire (melting) deoarece încălzirea furnizează energia necesară ruperii legăturilor de hidrogen. Denaturarea începe în regiunile bogate în *A–T* și continuă în cele cu un conținut crescut în *G–C*.

Valorile t_m cresc direct proporțional cu conținutul în *G–C*, datorită cantității mai mari de energie necesară pentru a desface cele trei legături de hidrogen dintre guanină și citozină, spre deosebire de perechea *A–T*, care prezintă numai două legături de hidrogen.

Prezența bazelor purinice și pirimidice în structura ADN conferă acestuia proprietatea de adsorbție a radiațiilor UV cu λ=260 nm, lungime de undă folosită

pentru determinarea cantitativă a ADN. Adsorbţia ADN dublucaternar (ADN*dc*) nativ la 260 nm este mai mică decât adsorbţia mononucleotidelor sale componente, fenomenul fiind denumit efect hipocromic. Efectul hipocromic se datorează interacţiunii bazelor azotate din structura ADN, fapt care diminuează cantitatea de lumină ce poate fi adsorbită de fiecare bază. Dacă ADN este denaturat termic se produce o creştere a absorţiei luminii la λ–260 nm de circa 40%, în funcţie de tipul de ADN, fenomen cunoscut sub denumirea de efect hipercromic. Acest efect creşte cu conţinutul în *A–T*, iar temperatura de topire cu conţinutul în *G–C*. t_m este atins când aproximativ 50% din ADN*dc* devine monocatenar. t_m creşte cu creşterea concentraţiei de ioni şi descreşte în prezenţa formamidei sau dimetilsulfoxid (DMSO). Valorile adsorbţiei la 260 nm se înscriu în grafic, rezultând curba de efect hipercromic. În funcţie de t_m se exprimă % molar *G+C*, folosind formula Owen:

$$G + C = 2{,}08 * t_m - 106{,}4$$

Ca ADN de referinţă poate fi folosit ADN extras din *E.coli* K–12 care are un $t_m = 75{,}5$ şi un conţinut în *G+C* =50,6 %.

Ca urmare a determinării compoziţiei ADN la o mare varietate de microorganisme se pot face următoarele corelări:

– organismele cu fenotipuri similare adesea, dar nu totdeauna, posedă % molar similar de *G+C*;

– dacă două microorganisme sunt foarte apropiate fenotipic dar au % molar de *G+C* foarte deosebit, o examinare mai atentă arată că microorganismele nu sunt chiar atât de înrudite cum s-a presupus iniţial;

– două organisme pot avea % molar identic, dar să nu fie înrudite (taxonomic şi filogenetic), deoarece este posibilă o mare varietate de secvenţe ADN la aceeaşi compoziţie de baze.

Determinarea % molar de baze la organisme este necesară pentru identificarea unui gen nou sau a unei specii noi. În realitate procentul molar de *G+C* este un determinant negativ de excludere, întrucât o valoare apropriată din două surse diferite de ADN nu este obligatoriu să aibă secvenţe similare de ADN. Pe de altă parte, organisme cu diferenţe semnificative în conţinut molar *G+C* arareori au secvenţe ADN comune, altfel spus, % *G+C* este util pentru a demonstra că organismele nu sunt înrudite.

La bacterii conţinutul în *G+C* este variabil fiind cuprins între 25% (unele specii de *Clostridium*) şi 70% (unele specii de *Pseudomonas*).

Se admite că variabilitatea între aceleaşi specii trebuie să fie <2,5%. Această tehnică este frecvent aplicată în taxonomie. De exemplu, pe baza determinării conţinutului molar în *G+C* a fost posibilă excluderea speciei *Proteus*

morganii (% molar *G+C* 50%) (conținut molar *G+C* =39–40%) și transferarea acesteia în genul *Morganella* și integrarea genului *Yersinia* (*G+C* = 45,8 – 46,8), în *Enterobacteriaceae* (*G+C* = 45–58%). Totuși, unii autori au demonstrat recent prin alte metode mai precise că bacteriile cu conținut % *G+C* foarte diferit pot aparține aceluiași gen.

Hibridizare ADN/ADN. Omologia moleculelor de ADN presupune o referire la secvența în baze azotate a moleculelor luate în studiu. Secvențele ADN pot fi similare și complementare. Similaritatea între două secvențe este dată de existența unei identități în ceea ce privește proporția de baze (ADN*mc*) sau în perechi de baze (ADN*dc*). Complementaritatea este determinată de regulile de împerechere dintre adenină și timină, respectiv guanină și citozină, astfel încât să se respecte principiul complementarității catenelor în molecula de ADN*dc*. Complementaritatea poate fi măsurată direct prin capacitatea a două molecule de ADN de a hibridiza. Dacă două molecule de ADN sunt denaturate la monocatene, complementaritatea dintre cele două monocatene poate fi utilizată pentru a indica gradul de similitudine dintre cele două duplexuri parentale.

Capacitatea a două monocatene de a reface dublul helix pe bază de complementaritate se numește renaturare pentru ADN provenit de la aceeași sursă și hibridizare pentru ADN provenit din surse diferite.

Procesul de renaturare, respectiv hibridizare decurge în două trepte:

– cele două catene se întâlnesc aleator în soluție și, dacă secvențele lor sunt complementare, cele două molecule vor genera o regiune dublucatenară;

– regiunea dublucatenară se va extinde la nivelul întregii molecule, procesul putând fi asimilat cu închiderea unui fermoar ("Zipper – like effect"). Renaturarea dublu helix restabilește proprietățile care s-au pierdut în timpul procesului de denaturare.

În prezent există numeroase tehnici de realizare a hibridizării. Tehnicile diferă în ceea ce privește faza de renaturare care este, de obicei, lichidă, dar unii autori folosesc gel agaroză sau membrane (filtre) de nitroceluloză și tehnica de separare pentru ADN*mc* sau *dc*.

Hibridizarea în soluție nu este cea mai eficientă metodă pentru determinarea gradului de înrudire dintre două probe de ADN, datorită faptului că în timpul amestecării celor două monocatene apar două tipuri de reacție:

– catene complementare provenite din aceeași moleculă de ADN pot renatura cu refacerea moleculei originare;

– fiecare monocatenă a unei molecule de ADN dintr-o sursă poate hibridiza cu alta, provenită din ADN-ul celeilalte surse. Acest neajuns poate fi eliminat prin imobilizarea monocatenelor provenite de la una din surse, astfel încât aceasta să nu poată renatura.

Hibridizarea pe membrane de nitroceluloză necesită următoarele operațiuni:

– extracția ADN și marcarea radioactivă (^{32}P sau ^{3}H) a unui ADN, exemplu ADN *A* notat ca *A**;

– legarea ADN-ului *A* nemarcat pe filtru de nitroceluloză după denaturare termică (100°,5');

– fragmentarea ADN *A** și *B* prin sonicare pentru a mări frecvența coliziunii fragmentelor heterologe;

– denaturarea termică a *A** și *B*;

– hibridizarea: va exista o competiție între ADN *A** și ADN *B* pentru ADN *A* fixat pe filtru.

Se vor reasocia aproximativ de 1500 ori mai mult *B* decât *A**, astfel că monocatena marcată va avea puține ocazii de legare. După 16 ore de incubare la temperatura t_m =25°C, radioactivitatea de pe filtre va fi comparată cu controlul de 100% (ADN *B* este înlocuit cu *A*) și 0% (amestec conținând numai *A**).

Tehnica pe coloană de hidroxilapatită. Hidroxilapatita este un fosfat de calciu care permite separarea ADN*mc* de ADN*dc*. ADN-ul este legat de hidroxilapatită și apoi eluat diferențiat:

– cu tampon fosfat de molaritate mai mică de 0,20 m este eluat numai ADN*mc*;

– cu tampon fosfat de molaritate mai mare de 0,20 m sunt extrase toate mono și dicatenele ADN *A*, *A** și *B* sunt incubate la t_m = 25°C, timp de 16 ore, apoi trecute pe coloană de hidroxil apatită, menținută la t_m = 25°C și condiționată cu tampon fosfat 0,14 m. După câteva spălări ADN-ul nehibridizat este eluat. Dacă tamponul de spălare nu este radioactiv, duplexurile sunt eluate cu tampon fosfat 0,3 m. Se compară apoi radioactivitatea fracțiunilor eluate.

Tehnica cu nuclează S1. Endonucleaza este extrasă din *Aspergillus oryzae* care separă ADN*dc* în ADN*mc*. ADN*dc* rămas este înlăturat din nucleotide prin precipitare cu acid tricloracetic și adsorbție pe dietilaminoetil celuloză (DEAC) celuloză. Comparând radioactivitatea filtrelor care au adsorbit amestecul hibridizat după acțiunea nucleazei sau în lipsa acesteia, se poate deduce procentul de hibridizare. ADN-ul trebuie la început să fie dializat, deoarece SDS inactivează nucleaza S1. Deoarece activitatea nucleazei depinde de concentrația ADN, este necesar adaosul de ADN heterolog transportor (spermă de somon, sau timus de vițel).

Această tehnică face posibilă eliminarea monocatenei "ac de păr" (hair pins) (fig 2.5).

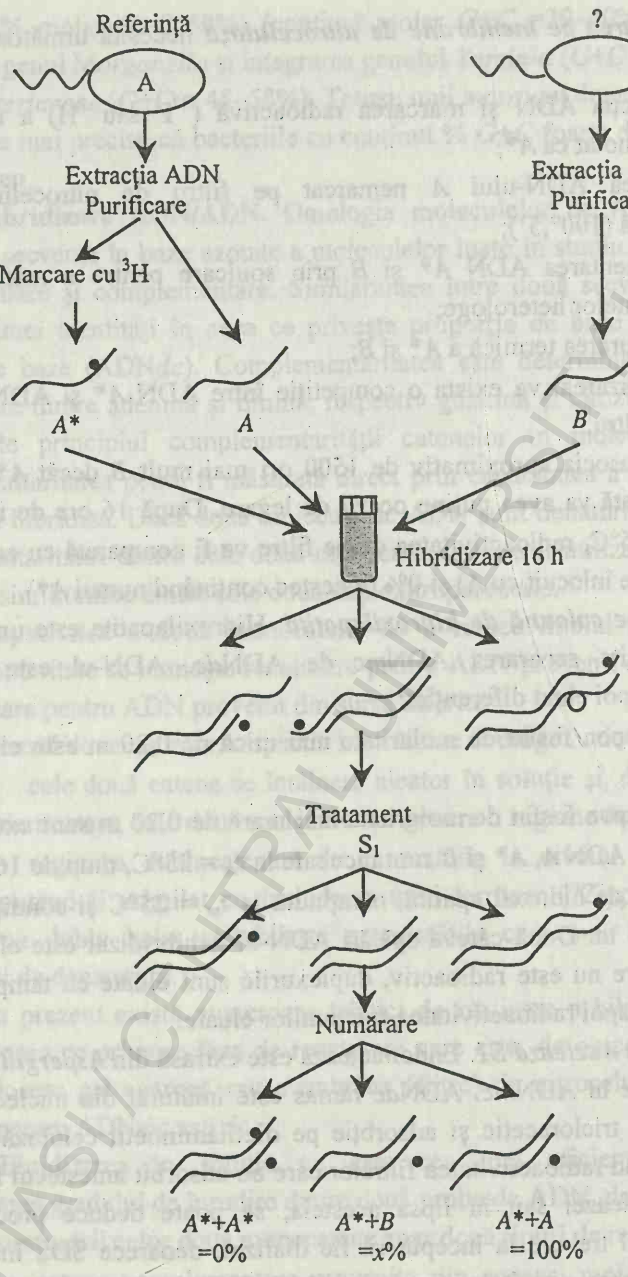


Fig.2.5. Principiul hibridizării prin tehnica cu nuclează S1. Există o competiţie dintre ADN *A** şi ADN *B* pentru ADN *A*. Se vor amesteca aproximativ de 1500 ori mai mult *B* decât *A**, în aşa fel ca monocatenele marcate să aibă puţine şanse de reasociere. Tratamentul cu nuclează S1 elimină posibilitatea monocatenelor "ac de păr".

UAIASI/CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Tehnica optică. Constă în măsurarea vitezei renaturării hibridului. Este o tehnică rapidă şi nu necesită folosirea izotopilor radioactivi. Inconvenientul constă în faptul că poate fi studiată o singură probă o dată, precum şi în dificultatea studierii stabilităţii duplexurilor.

Stabilitatea hibrizilor. În timpul hibridării se formează două tipuri de hibrizi: *specifici,* corespunzător unor secvenţe complementare, şi *fragili,* în care două monocatene sunt faţă în faţă, dar au puţine baze aranjate în secvenţe complementare.

Stabilitatea hibrizilor şi prin aceasta specificitatea lor poate fi măsurată prin studiul cineticii denaturării hibridului la o creştere treptată a temperaturii. $t_{m(e)}$ (punctul termal de eluţie) este temperatura de topire a hibridului, adică temperatura la care 50% din radioactivitate poate fi eluată din duplex. Diferenţa stabilităţii termice $\Delta\ t_{m(e)}$, din $t_{m(e)}$ a heteroplexului şi cea a hemoduplexului reprezintă gradul de stabilitate a heteroplexului. Numeroase studii au demonstrat că stabilitatea termică este corelată cu procentul de baze libere (1% baze libere pentru un $\Delta\ t_{m(e)}$ la 1,6°C).

Interpretarea rezultatelor. Cele trei tehnici hidroxilapatită, fixarea pe celuloză şi metoda optică, dau rezultate similare. Metoda cu nuclează S1 dă valori uşor mai ridicate (10–15%) şi de aceea în aprecierea rezultatelor se impune specificarea metodei folosite.

O valoare mai mică de 20% (pentru hidroxilapatită) sau 30% (pentru nucleaza S1) corespunde la o înrudire genetică slabă între microorganisme; de aceea, interpretarea trebuie să ţină cont de valorile de omologie şi stabilitate termică. O omologie superioară valorii de 70% şi o bună stabilitate termică ($\Delta t_{m(e)}$ <= 5°C) reprezintă un criteriu care atestă apartenenţa la aceeaşi specie.

În zona (30–70%) trebuie emisă ipoteza că cele două specii aparţin aceluiaşi gen. Indicele $t_{m(e)}$ este cel mai folositor în această zonă.

În ceea ce priveşte drojdiile, aceste valori sunt mai ridicate, situându-se între 80 şi 100%. Utilizând metoda de determinare spectofotometrică, s-a stabilit că tulpinile de drojdii care prezintă 90–95% omologie de secvenţă ADN sunt conspecifice. Rămânând în domeniul drojdiilor, interpretarea datelor obţinute în experienţele de reasociere ADN/ADN se complică, depinzând de tipul de ADN folosit, ADN total, ADN nuclear purificat, ADN mitocondrial sau ADN*r*. În acest sens, un rol important îl are prezenţa ADN repetitiv. Cum renaturarea este dependentă de numărul secvenţelor de ADN complementare, este evident că ADN repetitiv va renatura mai repede decât cel non-repetitiv reprezentat de secvenţe unice. De aceea, procesul de renaturare este rezultanta a două reacţii: renaturarea rapidă a secvenţelor de ADN repetitiv sau ADN mitocondrial, dacă este cazul, şi renaturarea mai lentă a fragmentelor unice de ADN.

Se poate concluziona că procesul de reasociere a ADN este efectuat de mărimea şi structura genomului care constituie factori importanţi în evaluarea gradului de omologie ADN/ADN.

Condiţiile de reacţie sunt, de asemenea, determinante în succesul reacţiei de reasociere astfel:

– creşterea tăriei ionice a mediului de reacţie creşte viteza de reacţie, în sensul că folosirea unui tampon salin citrat 2x(0,15mM clorură de sodiu) 0,015 mM citrat de sodiu, *p*H=7 permite parcurgerea procesului într-un timp relativ scurt;

– temperatura optimă de reasociere a ADN este cu 25...30°C mai mică decât valoarea t_m;

– concentraţia iniţială a probei de ADN afectează viteza de reacţie, crescând conţinutul ADN în probe, între anumite limite.

ARN - ribozomal. Moleculele de ARN-ribozomal (ARN*r*) sunt considerate molecule de ceas sau cronometru molecular. În scopul reordonării în arbori filogenetici a genurilor de microorganisme şi chiar specii se folosesc moleculele de ceas molecular datorită, în principal, a trei parametri:

– constanţa fiziologică a moleculei la un număr foarte mare de organisme, ceea ce presupune că funcţia îndeplinită de molecule este supusă unei presiuni selective mari;

– molecula acoperă limite filogenetice mari;

– dimensiune suficient de mare a moleculei, ca să cuprindă suficient de multă informaţie.

Hibridizare ADN/ARN. Tehnicile de hibridizare ADN/ARN*r* sunt comparabile cu cele descrise la hibridizarea ADN/ADN. Se realizează în mod obişnuit pe membrane de nitroceluloză. Din ribozomi va fi izolat ARN*r* total sau numai una sau două fracţii 16S sau 23S, vor fi marcate cu izotopi radioactivi şi hibridizate cu ADN*mc* legat de membrana nitrocelulozică. Relaţia dintre cei doi ARN*r* este apreciată prin diferenţa dintre stabilitatea termică a hibrizilor.

Folosind această metodă se poate determina o omologie mai mare de 90% la speciile din familia *Enterobacteriaceae*. Cele cinci grupe genetice ale genului *Pseudomonas* au fost descrise pe baza hibridizării ADN/ARN*r*.

Secvenţierea ARN*r*. ***Bacterii*** – speciile moleculare de ribozomi 5S şi 23S. Secvenţele de codificare pentru ARN*r* sunt printre moleculele cele mai înalt conservate în timpul evoluţiei. Studiile efectuate au făcut posibilă atât cunoaşterea relaţiilor dintre specii, cât şi dintre genuri şi grupuri de genuri.

Secvenţierea ARN*r* s-a efectuat pentru prima dată în 1970 în Urbana Illinois, S.U.A. Metoda constă în stabilirea, pentru fiecare organism studiat, a unei liste de oligonucleotide derivate din ARN*r* 16S, după hidroliză cu nuclează T1

extrasă din *Aspergillus oryzae*. A fost aleasă specia moleculară 16S, deoarece este mai stabilă decât ARN 5S şi mai uşor de secvenţializat decât ARN*r* 23S.

Principiul tehnicii este următorul: marcarea cu ^{32}P radioactiv *in vivo*, în timpul fazei de creştere, extracţia ARN, separarea ARN*r* 16S prin electroforeză în gel de poliacrilamidă, digestia cu nuclează T1 care va produce o breşă între gruparea 3'-acid guanilic şi gruparea 5'hidroxil a nucleotidului adiacent. Reziduurile sunt formate din 15–20 nucleotide şi conţin numai guanină la capătul 3'. Aceste nucleotide sunt separate prin electroforeză bidimensională: prima dimensiune pe acetat de celuloză la *p*H = 3,5 şi a doua dimensiune pe DEAE celuloză.

În aceste condiţii, spoturile formează trei, patru serii de *pattern*-uri sub formă de pană. Fiecare *pattern* corespunde numărului de uracil. În interiorul *pattern*-ului poziţia spotului depinde numai de compoziţia în adenină şi citrozină. Spoturile pot fi eluate şi studiate prin digestie cu ribonucleaze diferite şi migrare pe DEAE celuloză. În final este alcătuită o listă de oligonucleotide şi numărul de moli din fiecare. Compararea celor două organisme se face prin calcularea indexului de similaritate. Aplicarea metodei numerice de calcul va face posibilă clasificarea şi schiţarea unei dendograme.

Metodele de secvenţiere după amplificare prin PCR (polymerase chain reaction) a fost aplicată pentru studiul ARN 16S. Sunt folosiţi amplimeri (primeri corespunzători ARN 16S pentru amplificare). Această tehnică permite secvenţierea ARN 16S şi prin aceasta cunoaşterea poziţiei taxonomice a microorganismelor necultivabile.

Drojdii. Diferenţa dintre hărţile de restricţie, obţinute de la doi indivizi, este numită polimorfismul lungimii fragmentelor de restricţie (RFLP – restriction fragment length polymorphism). Acest polimorfism poate fi folosit ca un marker genetic în evaluarea genotipului.

În prezent, în taxonomia drojdiilor se foloseşte RFLP pe ADN*r*, adică pe secvenţe de ADN care codifică pentru diferite clase de ARN ribozomal. Rezultatul va fi de fapt o analiză comparativă a secvenţei moleculelor de ARN*r* (25S, 28S, 18S şi 5S), care a permis reordonarea în arborii filogenetici deja cunoscuţi a numeroase genuri, specii şi chiar tulpini de drojdii, precum şi recalcularea distanţei dintre acestea.

Interesul pentru studiul ARN*r* se datorează următoarelor caracteristici ale acestuia:

– ribozomii sunt prezenţi în toate organismele, au aceeaşi origine genetică la toate organismele vii;

– unele secvenţe de ARN*r* sunt înalt conservate şi omoloage pentru toate organismele şi servesc ca puncte de reper care permit utilizarea secvenţelor variabile ca unităţi de măsură a modificărilor survenite în cursul evoluţiei;

– genele pentru ARN*r* se găsesc în număr mare de copii şi, din această cauză, constituie un material propice pentru reacţiile de restricţie.

Pentru determinarea secvenţei ARN*r*, în prezent se practică două variante.

Într-o primă etapă se realizează amplificarea şi izolarea genelor din genomul de drojdie prin PCR:

– genele amplificate sunt clonate în vectori de tip fagimid (de exemplu, *p*Bluescript SK/KS +/–);

– prin transcriere *in vitro* în condiţii specifice pornind de la promotorii T7 sau T3 se obţin molecule de ARN mesager (ARN*m*) sens sau antisens;

– moleculele de ARN*m* obţinute sunt supuse secvenţierii.

Pe o populaţie heterogenă de drojdii sau bacterii se realizează hibridizarea cu sonde marcate, corespunzătoare genelor pentru ARN*r* specific subunităţilor mari ale ribozomilor de la eucariote şi procariote (de exemplu 18S respectiv 16S);

– se realizează amplificarea şi izolarea prin PCR numai a genelor de interes – ARN*r* 18S pentru drojdii;

– se realizează restricţia ADN*r* 18S şi se deduce prezenţa ARN*r* 18S din secvenţa ADN*r* corespunzător.

"Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" este un compendium de informaţii clasice şi moleculare referitoare la toate speciile de procariote şi conţine un număr de chei dicotome care permite identificarea lor. Deşi este un tratat de taxonomie şi nu de filogenie, ultima ediţie a manualului a încorporat şi unele informaţii privind studii de secvenţiere a moleculelor specifice pentru descrierea diferitelor grupuri de microorganisme.

"Bergey's Manual" este format din 4 volume. Volumul I conţine informaţii referitoare la bacterii Gram-negative de interes medical şi industrial; volumul II – la bacterii Gram-pozitive de interes medical şi industrial; volumul III – la bacteriile Gram-negative neincluse în volumul I, *Archaea* şi *cianobacteriile*; volumul IV – la bacteriile Gram-pozitive filamentoase formatoare de spori (*Actinomyces*). Descrierea genurilor existente în "Bergey's Manual" este cuprinsă în Anexa 3 a cărţii.

Deşi "Bergey's Manual" recunoaşte contribuţia filogeniei moleculare la evoluţia bacteriilor, manualul descrie grupurile taxonomice clasice, întrucât nu este clar modul în care studiile de secvenţiere moleculară vor afecta aspectele de nomenclatură ale taxonomiei.

3 METABOLISMUL MICROBIAN

3.1. BAZELE METABOLISMULUI

În celule reacţiile nu decurg izolat, ci organizat în secvenţe multiple formând aşa-numita *cale metabolică*, în care produsul unei reacţii serveşte ca substrat reacţiei următoare. Ca urmare, diferitele căi se intersectează formând o reţea de reacţii biochimice integrate şi cu un scop final denumită *metabolism* (fig.3.1).

Metabolismul se studiază în mod obişnuit prin examinarea componentelor acestuia. Fiecare metabolism este compus din secvenţe multienzimatice şi fiecare enzimă, la rândul ei, poate exercita o acţiune catalitică sau reglatoare. Harta metabolică conţine căile centrale ale energeticii metabolismului, redate în fig. 3.2.

Majoritatea căilor metabolice pot fi clasificate în *căi catabolice* (degradative) şi *căi anabolice* (sintetice). Reacţiile catabolice degradează molecule complexe ca proteine, poliglucide şi lipide, la câteva molecule simple, de exemplu CO_2, NH_3 şi apă. Calea anabolică formează produşi finali complecşi din precursori simpli.

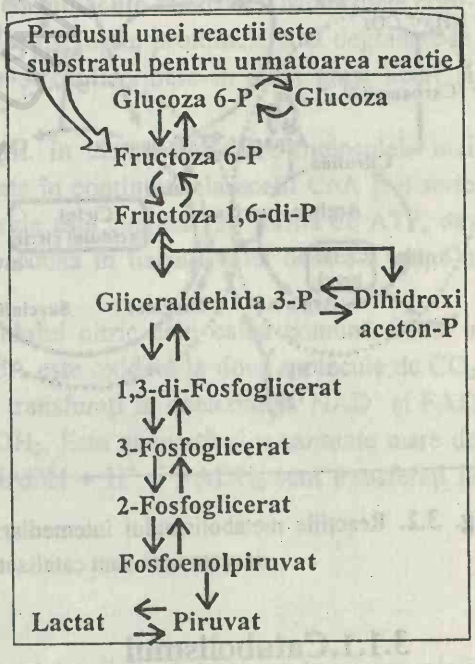


Fig. 3.1. Glicoliza. Săgeţile curbe indică direcţia reacţiilor catalizate de diferite enzime.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

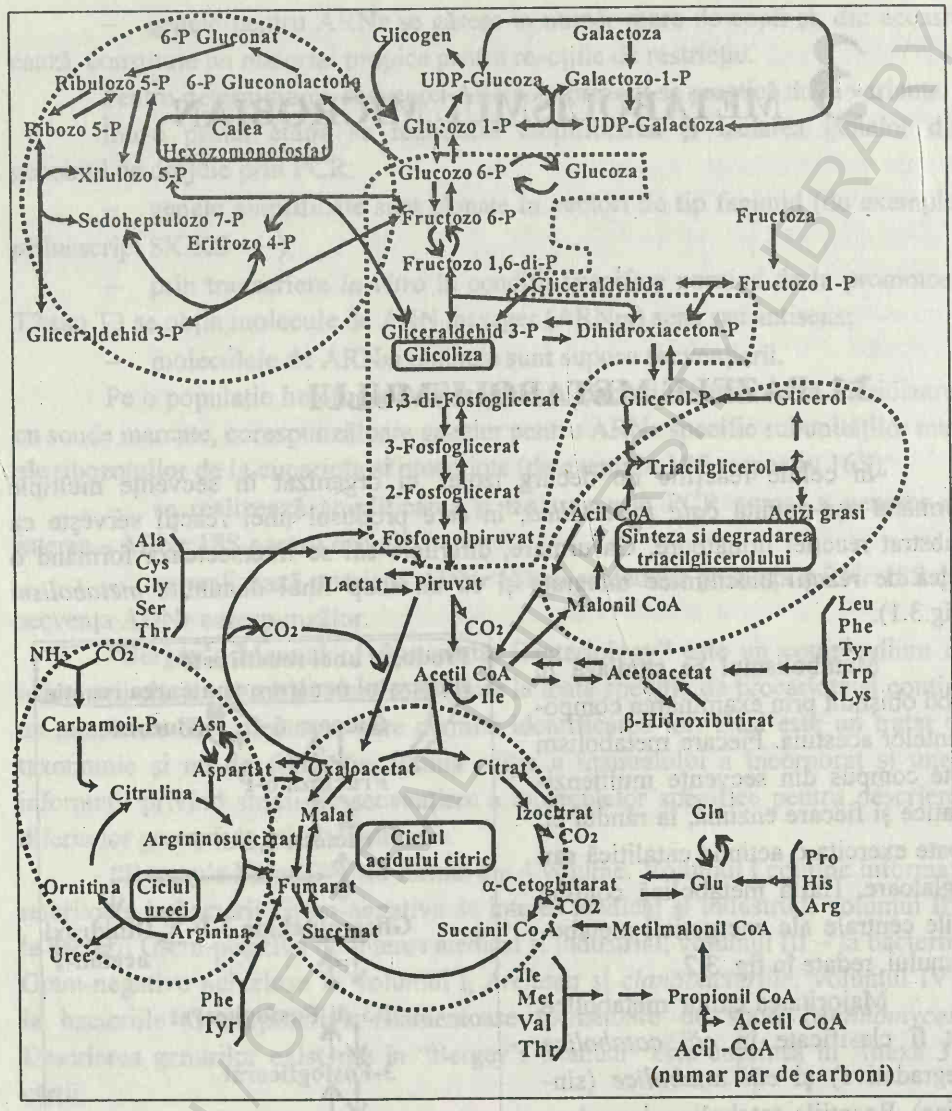


Fig. 3.2. Reacţiile metabolismului intemediar. Săgeţile curbe indică reacţiile directe şi inverse care sunt catalizate de diferite enzime.

3.1.1.Catabolismul

Reacţiile catabolice au rolul de a capta energia chimică (sub formă de ATP) prin degradarea moleculelor bogate în energie. Catabolismul generează, de asemenea, molecule care sunt convertite în "cărămizi" de construcţie, necesare sintezei de molecule complexe. Generarea energiei prin degradarea moleculelor

complexe se desfăşoară în trei etape (fig.3.3), care sunt prezentate în cele ce urmează.

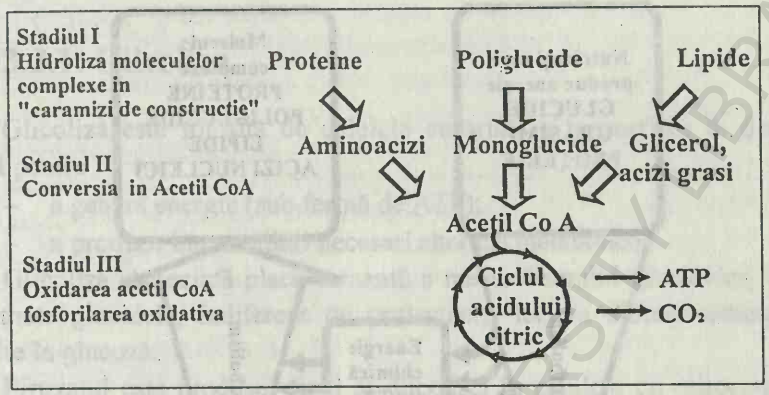


Fig. 3. 3. Etapele catabolismului.

Hidroliza moleculelor complexe în molecule mai mici. Moleculele complexe sunt degradate în molecule simple. De exemplu, proteinele sunt degradate în aminoacizi, poliglucidele în monoglucide şi trigliceridele în acizi graşi liberi şi glicerol.

Conversia în intermediari simpli. În etapa următoare moleculele mai mici, rezultate în prima fază, sunt degradate în continuare la acetil CoA şi o serie de alte molecule simple. O parte din energie este captată sub formă de ATP, dar cantitatea este mică comparativ cu cea produsă în timpul celei de-a 3-a etape a catabolismului.

Oxidarea acetil CoA. Ciclul acidului citric este calea comună finală a oxidării moleculelor de rezervă. Acetil CoA este oxidată la două molecule de CO_2 şi patru perechi de protoni (H) care sunt transferaţi la coenzimele NAD^+ şi FAD pentru producerea de NADH + H^+ şi $FADH_2$. Este generată şi o cantitate mare de energie din ATP, când electronii de la NADH + H^+ şi $FADH_2$ sunt transferaţi la oxigen în fosforilarea oxidativă.

3.1.2. Anabolismul

Reacţiile anabolice combină moleculele mici ca, de exemplu, aminoacizii, pentru a forma molecule complexe ca, de exemplu, proteinele (fig.3.4). Reacţiile anabolice necesită energie, care este asigurată de transformarea ATP în ADP şi P_i. Calea de biosinteză pentru aceste molecule este în mod obişnuit diferită de calea degradativă, şi cele două procese răspund diferit la semnalele reglatoare. Reacţiile

anabolice presupun adesea reducere chimică, asigurată de NADPH care funcţionează ca donor de electroni.

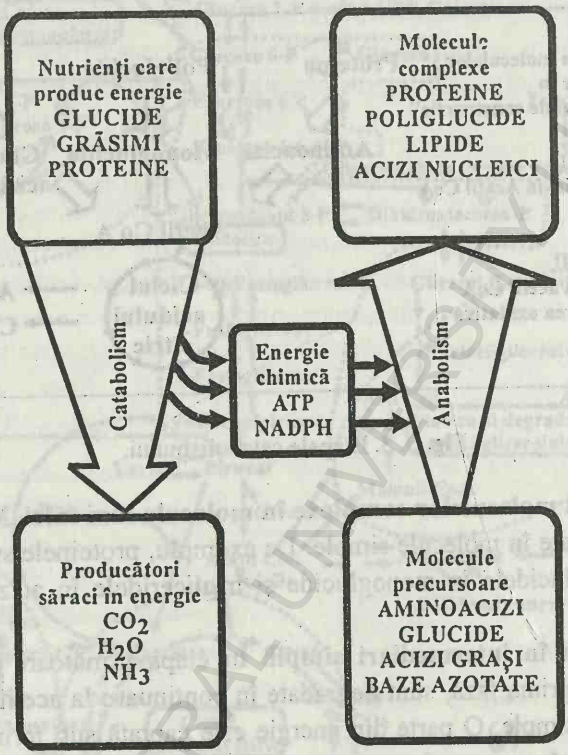


Fig. 3.4. Comparaţie între calea catabolică şi calea anabolică.

În concluzie, catabolismul este un proces *convergent*, prin care o mare varietate de molecule sunt transformate în puţine produse finale. Din contră, anabolismul este un proces *divergent*, în care câţiva precursori de biosinteză formează o largă varietate de complexe polimerice.

3.2. CĂI DE DEGRADARE A SUBSTRATULUI (CATABOLISM)

Principala sursă de carbon utilizată în procesele de biosinteză o constituie glucidele. Microorganismele metabolizează glucidele în mod diferit, în funcţie de specie şi de condiţiile mediului exterior în care sunt obligate să se dezvolte.

Căile de degradare a substratului în celulele microbiene sunt, în general, comune cu cele ce au loc în orice fel de celule vii, cu modificările specifice survenite pentru fiecare caz în parte.

3.2.1. Glicoliza

Glicoliza este folosită de celulele eucariote şi procariote la degradarea glucozei pentru :

- a genera energie (sub formă de ATP);
- a produce intermediari necesari altor căi metabolice.

Glicoliza reprezintă placa turnantă a metabolismului glucidelor, deoarece virtual toate glucidele, indiferent de proveniența lor, în ultimă instanță pot fi convertite în glucoză.

Piruvatul este produsul final al glicolizei în celulele cu mitocondrii care sunt aprovizionate cu o cantitate suficientă de oxigen.

Această serie de 10 reacții este denumită ***glicoliză aerobă***, deoarece *oxigenul* este necesar pentru reoxidarea NADH + H^+ format în timpul oxidării gliceraldehidei-3-fosfat (fig. 3.5, *A*). Glicoliza aerobă asigură decarboxilarea oxidativă a piruvatului la acetil CoA, *combustibilul* de bază pentru inițierea ciclului acizilor tricarboxilici. Alternativ, glucoza poate fi convertită la piruvat, care este redus de NADH + H^+ pentru formarea lactatului (fig. 3.5, *B*). Această degradare a glucozei la lactat este denumită *glicoliză anaerobă*, deoarece nu are loc o formare de NADH şi, deci, poate avea loc în absența O_2. Glicoliza anaerobă permite producția continuă de ATP în celulele lipsite de mitocondrii.

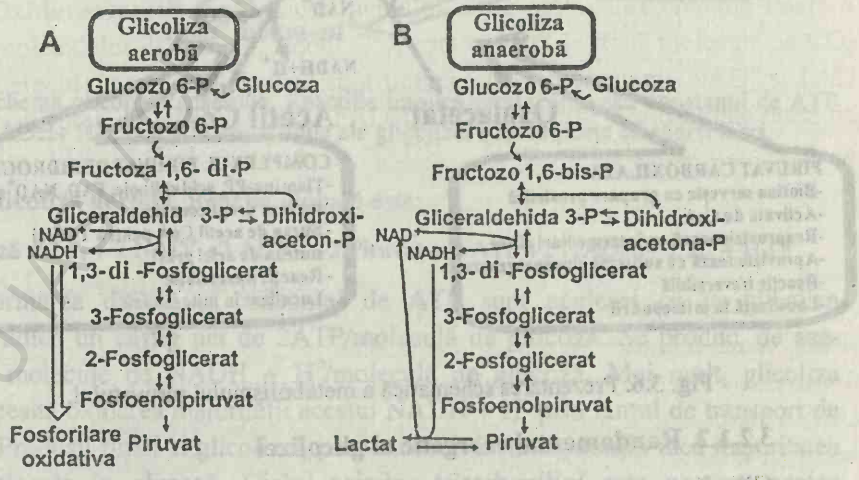


Fig. 3.5. Glicoliza, una dintre căile esențiale ale metabolismului energetic:
A – reacțiile glicolizei aerobe; *B* – reacțiile glicolizei anaerobe.

3.2.1.1. Căi altenative de transformare a piruvatului

Decarboxilarea oxidativă a piruvatului. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului de către complexul piruvat dehidrogenaza reprezintă o cale importantă, cu capacitate oxidativă ridicată atât în mușchiul cardiac cât și la microorganisme (fig.3.6). Piruvat dehidrogenaza convertește ireversibil piruvatul, metabolitul final al glicolizei, în acetil CoA, produs major pentru ciclul acizilor tricarboxilici și al produșilor necesari sintezei acizilor grași.

Carboxilarea piruvatului la oxaloacetat. Carboxilarea piruvatului la oxaloacetat cu ajutorul piruvat carboxilazei reprezintă o reacție dependentă de biotină (fig.3.6). Această reacție este importantă pentru că reaprovizionează ciclul acizilor tricarboxilici cu intermediari și asigură substratul pentru gluconeogeneză.

Reducerea piruvatului la metanol. Conversia piruvatului la metanol are loc în 2 etape incluse în fig.3.6; decarboxilarea piruvatului prin piruvat decarboxilază are loc la drojdii și unele microorganisme, și nu în celula animală. Enzima necesită tiaminpirofosfat drept coenzimă și catalizează reacții similare cu cele descrise pentru piruvat dehidrogenază.

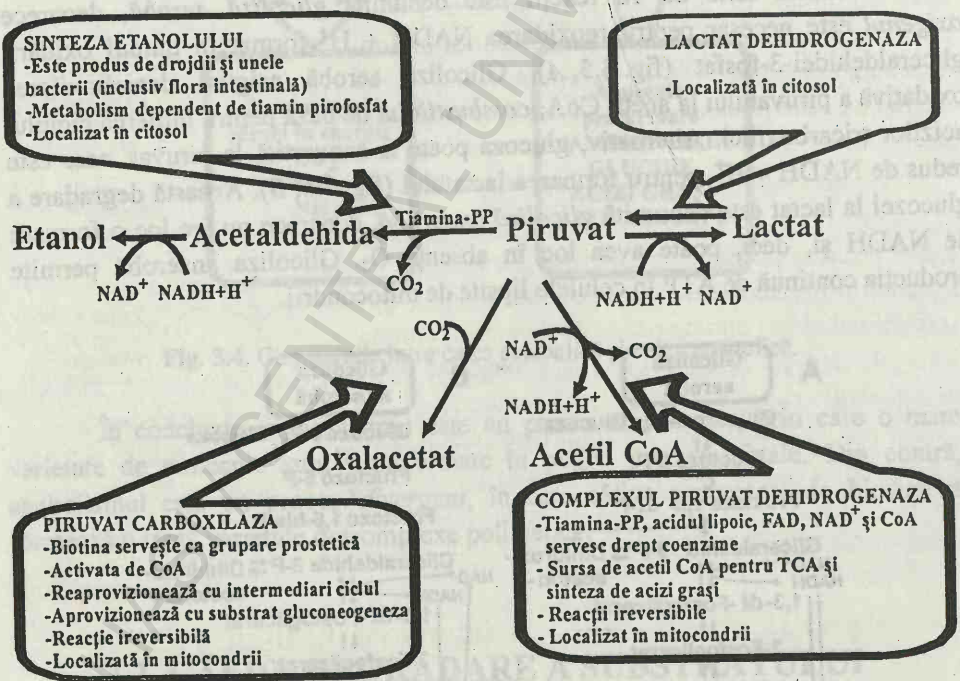


Fig. 3.6. Prezentarea schematică a metabolismului piruvatului.

3.2.1.2. Randamentul energetic al glicolizei

Glicoliza anaerobă. Reacția globală este următoarea:

$$\text{Glucoză} + 2\,P_i + 2\,ADP \rightarrow 2\,\text{Lactat} + 2\,ATP + 2\,H_2O$$

Producerea de ATP. Sunt generate 2 molecule de ATP pentru fiecare moleculă de glucoză convertită în lactat (fig.3.7). Deşi glicoliza anaerobă eliberează numai o mică fracţiune de energie conţinută în molecula de glucoză, aceasta este o sursă de energie valoroasă în unele condiţii şi anume când aprovizionarea cu oxigen este limitată sau în ţesuturi lipsite de mitocondrii.

Producerea de NADH+ H^+. În glicoliza anaerobă nu are loc o producere sau un consum net de NADH; NADH+ H^+ format de gliceroaldehid-dehidrogenaza este folosit de lactatdehidrogenază pentru reducerea piruvatului la lactat (fig.3.7). Se produc 2 molecule de lactat pentru fiecare moleculă de glucoză metabolizată.

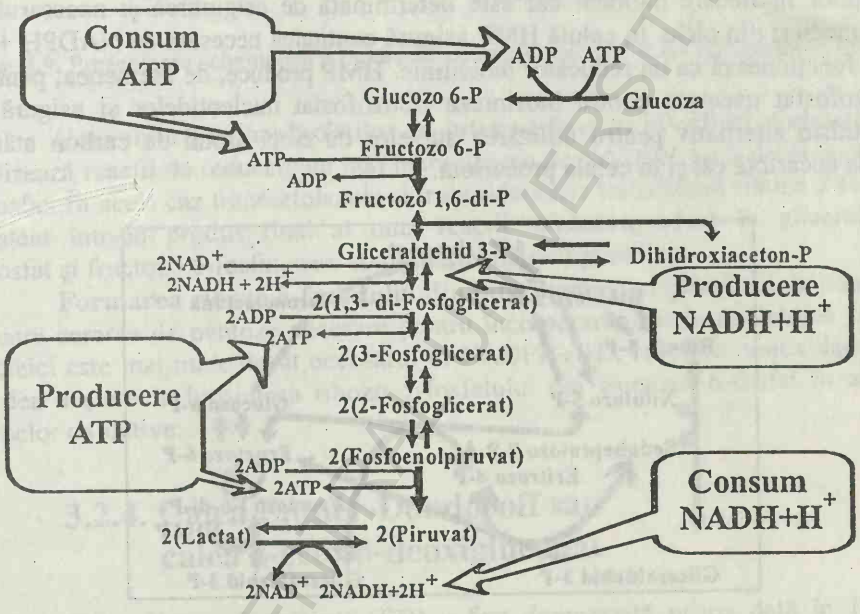


Fig. 3.7. Schema glicolizei anaerobe. Reacţiile implică producerea sau consumul de ATP sau NADH+ H^+. Reacţiile ireversibile ale glicolizei sunt indicate cu săgeţi mari.

Glicoliza aerobă. Reacţia globală este:

$$\text{Glucoză} + 2\,P_i + 2\,NAD^+ + 2\,ADP \rightarrow 2\,\text{Piruvat} + 2\,ATP + 2\,NADH + 2\,H^+ + H_2O$$

Formarea directă şi consumul de ATP sunt aceleaşi ca în glicoliza anaerobă, adică un câştig net de 2ATP/moleculă de glucoză. Se produc, de asemenea, 2 molecule de NADH + H^+/moleculă de glucoză. Mai mult, glicoliza aerobă necesită oxidarea majorităţii acestui NADH + H^+ prin lanţul de transport de electroni. Produşii finali ai glicolizei, piruvatul sau lactatul, conţin încă majoritatea energiei blocate în glucoză. Ciclul acizilor tricarboxilici este necesar pentru eliberarea completă a acestei energii.

3.2.2. Calea hexozomonofosfaților

Calea hexozomonofosfaților (HMP) – denumită, de asemenea, calea pentozofosfaților sau fosfogluconatului – este formată din două reacții ireversibile, urmată de o serie de interconversiuni de intermediari fosforilați (fig. 3.8). În ciclu nu se consumă sau nu se produce direct ATP. Carbonul 1 al glucozo 6-fosfatului este eliberat ca CO_2 și două molecule de NADPH + H^+ pentru fiecare glucozo 6-fosfat intrat în etapa oxidativă a ciclului. Spre deosebire de glicoliză sau ciclul acidului citric, în care direcția reacțiilor este bine definită, reacțiile de interconversiune ale ciclului HMP pot funcționa în diferite direcții. Viteza și direcția reacțiilor în fiecare moment dat este determinată de asigurarea și necesarul de intermediari din ciclu. În celulă HMP asigură cantitatea necesară de NADPH + H^+ care funcționează ca un reducător biochimic. HMP produce, de asemenea, pentoze ribozofosfat necesare pentru biosinteza ribozofosfat nucleotidelor și asigură un mecanism alternativ pentru utilizarea surselor cu cinci atomi de carbon atât în celula eucariotă cât și în celula procariotă.

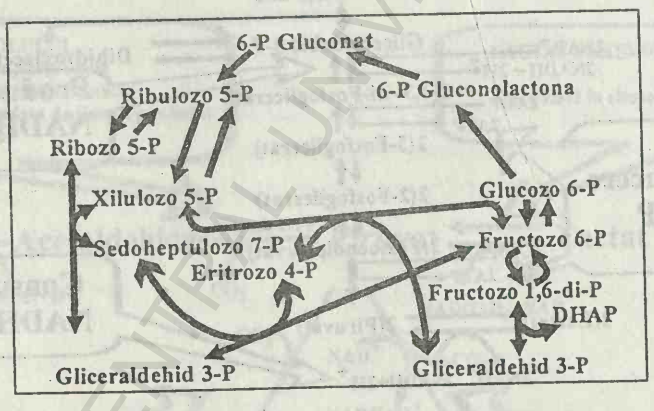


Fig 3.8. Calea hexozomonofosfat.

3.2.3. Conexiuni între calea glicolizei și calea hexozomonofosfat

Transformarea gliceraldehid 3- fosfatului în piruvat. Gliceraldehid 3-fosfatul poate fi transformat în piruvat de către bacterii aero-anaerobe, drojdii și fungi după formula:

$$\text{Glucoză} + 6\ NADP^+ \rightarrow \text{Piruvat} + 3\ CO_2 + 6\ NADPH + H^+$$

Gliceraldehid 3-fosfatul poate fi condensat, de asemenea, cu fructozo 6-fosfatul de către gliceraldehid P-aldolaza, prezentă la bacteriile aerobe după formula:

$$2\ \text{Gliceraldehid 3-fosfat} \rightarrow \text{Fructozo-6-fosfat} + P_i$$

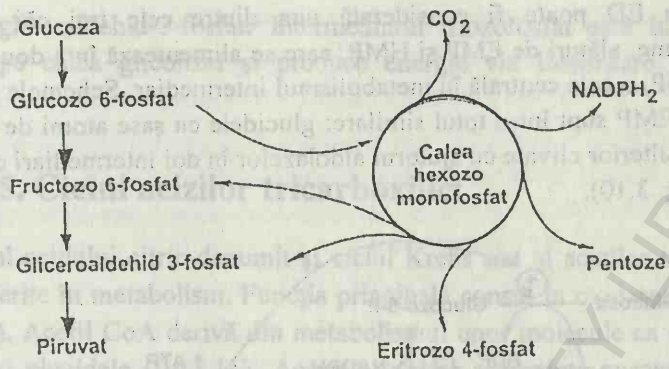


Fig. 3.9. Prezentarea schematică a raportului dintre glicoliză şi calea hexozomonofosfat.

Conversia pentozofosfaţilor în intermediari ai glicolizei. Celulele care realizează reacţii de reducere au mai mare nevoie de NADPH + H^+ decât de ribozo 5-fosfat. În acest caz transcetolazele şi transaldolazele transformă ribozo 5-fosfatul existent într-un produs final al unei reacţii oxidative, adică în gliceraldehid 3-fosfat şi fructozo 6-fosfat, care sunt intermediari ai glicolizei.

Formarea ribozo 5-fosfatului din intermediari ai glicolizei. În condiţiile în care cererea de pentoze necesare pentru încorporarea lor în nucleotide şi acizi nucleici este mai mare decât necesarul în NADPH+ H^+, reacţiile nonoxidative pot să dea naştere la biosinteza ribozo 5-fosfatului din fructozo 6-fosfat în absenţa etapelor oxidative.

3.2.4. Calea Entner-Doudoroff sau calea 2-ceto-3-deoxigluconat

Calea Entner-Doudoroff (ED) a fost descoperită prima dată în 1952 la *Pseudomonas saccharophila* şi ceva mai târziu la *Escherichia coli*. Deşi iniţial s-a considerat a fi specifică pentru tulpinile Gram-negative, calea ED este prezentă la cele trei ramuri filogenetice, incluzând şi *Archeea*. Ubicuitatea căii ED sugerează importanţa mult mai mare a acesteia în natură decât s-a recunoscut iniţial. Studii recente asupra evoluţiei căii glicolitice sugerează că ED a precedat calea EMP.

Biochimia şi fiziologia metabolismului acizilor zaharici la *E. coli*, precum şi noi gene care codifică transportorii acizilor zaharici, proteinelor reglatoare asociate şi noua cale catabolică a acizilor zaharici au putut fi identificate ca urmare a "proiectului genomului la *Escherichia coli*" (1997). Studiile au relevat că genele căii ED sunt prezente, de exemplu, în genomul de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* etc., fiind astfel evident că această cale ar putea fi una adiţională sau chiar nouă, după cum relevă analiza genetică a genomului microorganismelor citate mai sus.

Calea ED poate fi considerată una dintre cele trei căi prezente la microorganisme, alături de EMP şi HMP, care se alimentează în a doua jumătate a glicolizei EMP, o cale centrală în metabolismul intermediar. Schemele generale ale căilor ED şi EMP sunt întru totul similare: glucidele cu şase atomi de carbon sunt fosforilate şi ulterior clivate cu ajutorul aldolazelor în doi intermediari cu trei atomi de carbon (fig. 3.10).

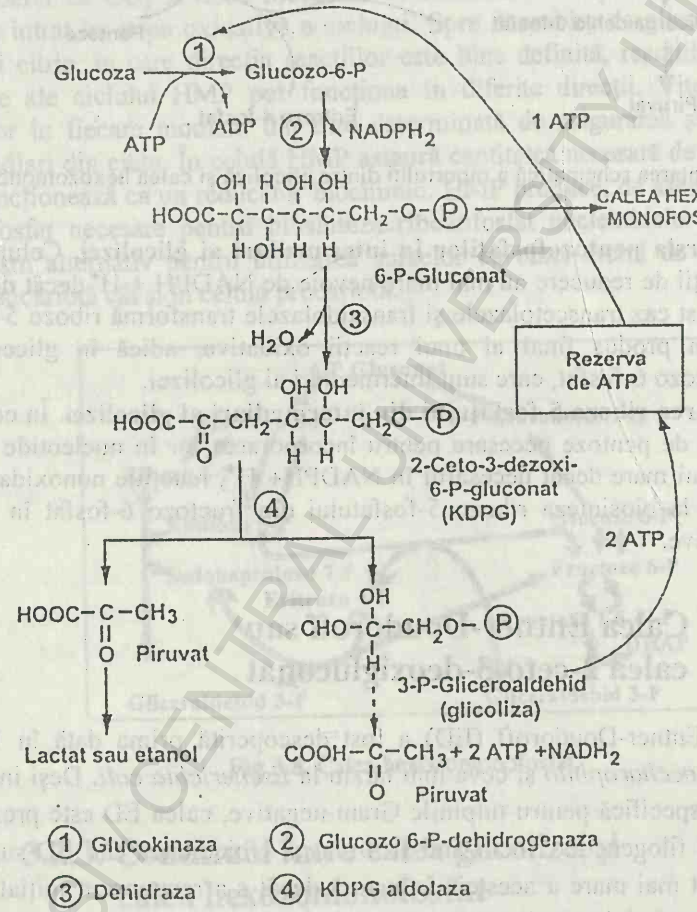


Fig. 3.10. Calea Entner-Doudoroff.

Prima deosebire între cele două căi constă în natura atomului C6 a metabolitului care serveşte ca substrat pentru clivarea aldolazică: pentru ED acest intermediar este **2 ceto-3 deoxi-6-fosfogluconat (CDPG)**. Prima din cele două enzime este unică pentru calea ED, 6-fosfogluconat dehidrataza (Edd) care catalizează dehidratarea 6-fosfogluconat cu formare de CDPG. Cea de-a doua enzimă a căii ED, CDPG aldolaza (Eda), catalizează o clivare aldol a CDPG cu

formare de gliceraldehid-3-fosfat. Intermediarul triozofosfat este în continuare metabolizat pe calea glicolizei şi produce energie via fosforilare la nivel de substrat.

3.2.5. Ciclul acizilor tricarboxilici

Ciclul acidului citric denumit şi ciclul Krebs sau al acizilor tricarboxilici are roluri diferite în metabolism. Funcţia principală constă în oxidarea acetil CoA la CO_2 şi apă. Acetil CoA derivă din metabolismul unor molecule ca aminoacizii, acizii graşi şi glucidele (fig.3.11). Această oxidare reprezintă aproximativ două treimi din totalul consumului de oxigen şi al producţiei de ATP la majoritatea organismelor animale, incluzând şi omul. Ciclul acidului citric participă, de asemenea, la un număr mare de reacţii de sinteză. De exemplu, ciclul participă la formarea glucozei din scheletul de carbon al aminoacizilor şi asigură "cărămizi de bază" pentru sinteza hemului. Ciclul este caracteristic pentru o serie de microorganisme.

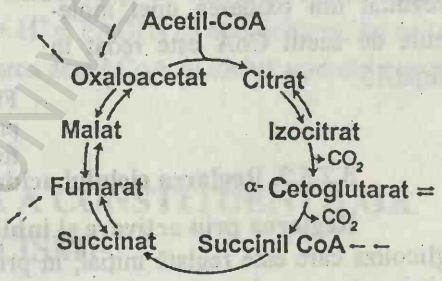


Fig 3.11. Ciclul acidului citric.

Iniţial, în ciclul acidului citric, oxalacetatul este condensat cu acetat, fiind regenerat la încheierea ciclului. Totuşi, aceste reacţii trebuie privite nu numai ca un ciclu închis, ci mai de grabă ca un ciclu de trafic prin care o serie de compuşi intră şi ies după necesităţi.

Compexul piruvat dehidrogenază este un complex multienzimatic. Converteşte piruvatul, produsul final al glicolizei, în acetil CoA, substratul major pentru ciclul acidului citric (fig.3.12). Ireversibilitatea reacţiei împiedică formarea piruvatului din acetil CoA şi explică de ce glucoza nu poate fi formată din acetil CoA în gluconeogeneză. Piruvat dehidrogenaza nu face parte propriu-zis din ciclul acidului citric, dar este o sursă importantă de acetil CoA, substrat cu doi atomi de carbon necesar ciclului.

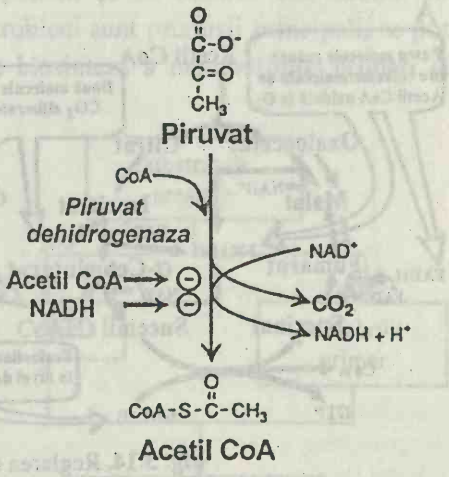


Fig 3.12. Decarboxilarea oxidativă a piruvatului.

3.2.5.1. Stoichiometria ciclului acidului citric

$$\text{Acetil CoA} + 3\ NAD^+ + FAD + GDP + P_i + 2H_2O \rightarrow$$
$$\rightarrow 2\ CO_2 + 3\ NADH + FADH_2 + GTP + 3H^+ + CoA$$

Rezultatul reacției. În ciclu intră doi atomi de carbon sub formă de acetil CoA şi ies tot doi sub formă de CO_2. Ciclul nu include un consum sau producție netă de oxaloacetat sau orice alt intermediar. Patru perechi de protoni sunt transferați în timpul unui parcurs de ciclu: trei perechi de protoni reduc NAD^+ la $NADH+H^+$ şi o pereche reduce FAD la $FADH_2$.

Randamentul de ATP. Oxidarea unui NADH prin lanțul de transport de electroni conduce la formarea a trei ATP, în timp ce oxidarea $FADH_2$ produce doi ATP. Randamentul total al ATP rezultat din oxidarea unei molecule de acetil CoA este redat în fig.3.13.

Reactii producatoare de energie	Numar de ATP formati
$3\ NADH \longrightarrow 3\ NAD^+$	9
$FADH_2 \longrightarrow FAD$	2
$GDP + P_i \longrightarrow GTP$	1
	12 ATP/acetil CoA oxidata

Fig 3.13. Numărul de molecule ATP produse prin oxidarea acetil CoA (folosind atât fosforilarea la nivel de substrat cât şi cea oxidativă).

3.2.5.2. Reglarea ciclului acidului citric

Reglarea prin activare şi inhibiție a activității enzimelor. În contrast cu glicoliza care este reglată inițial, în principal de *fosfofructokinază*, ciclul acidului citric este controlat prin reglarea activității mai multor enzime (fig.3.14). Cele mai importante enzime reglate sunt: *citratsintetaza, izocitrat dehidrogenaza şi complexul alfa cetoglutaratdehidrogenază.*

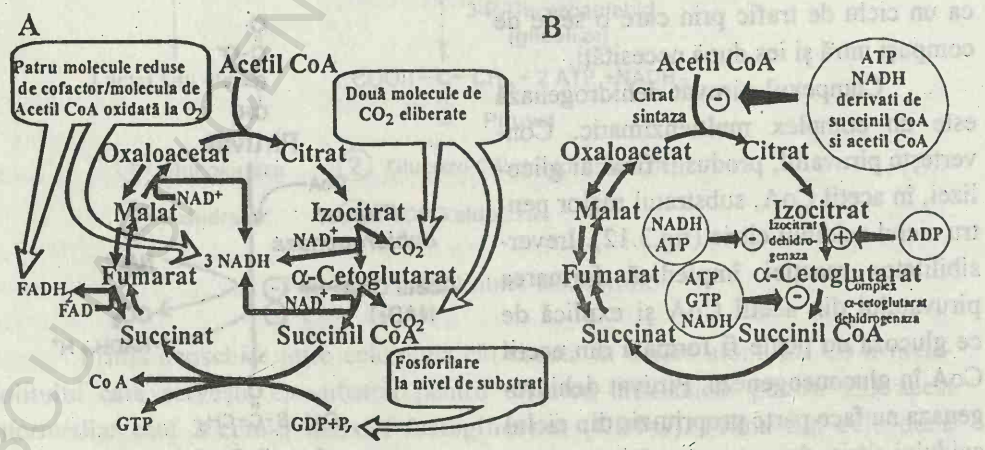


Fig. 3.14. Reglarea ciclului acidului citric:
A – producerea coenzimelor reduse şi CO_2 în ciclul acidului citric;
B – inhibitori şi activatori ai ciclului.

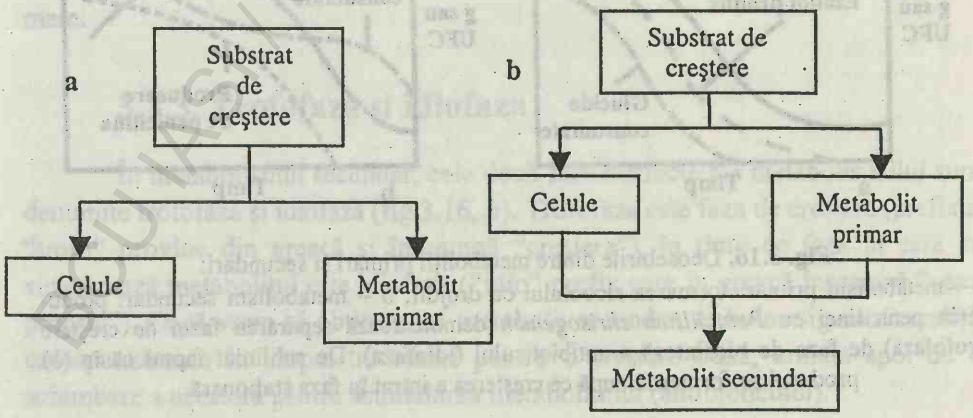
Reglarea prin ADP. Concentrațiile în ADP pot să fie crescute și scăzute.

Efectul ADP în concentrații crescute. Consumul de energie, pentru reacțiile de biosinteză sau alte procese conduc la hidroliza ATP în ADP și P_i. Creșterea consecutivă a concentrației ADP accelerează viteza reacțiilor care folosesc ADP pentru generare de ATP, cea mai importantă fiind fosforilarea oxidativă. Producția de ATP crește până ce se egalează cu viteza de consum a ATP-ului, în reacțiile care necesită energie.

Efectul concentrației scăzute de ADP. Dacă ADP sau P_i este în concentrații limitate, formarea de ATP prin fosforilare oxidativă descreşte datorită lipsei acceptorului de fosfor (ADP) sau fosforului anorganic (P_i). Viteza fosforilării oxidative este proporțională cu [ADP] [P_i]/ [ATP]. Acest fenomen este cunoscut drept control respirator al producerii de energie. Oxidarea NADH + H^+ și $FADH_2$ prin lanțul respirator se oprește, de asemenea, dacă ADP este în concentrație limită. Aceasta se datorează faptului că procesele oxidative și de fosforilare sunt strâns legate și pot decurge simultan. Dacă NADH+ H^+ și $FADH_2$ se acumulează, formele lor oxidative se epuizează determinând oxidarea acetil CoA în ciclul acidului citric, prin lipsa enzimelor oxidative.

3.3. CĂI DE BIOSINTEZĂ A CONSTITUENȚILOR CELULARI (ANABOLISM)

În procesele de creștere microbiană se evidențiază următoarele etape constând din fazele: *lag*, logaritmică, staționară și de moarte sau declin. În procesele industriale în care metaboliții microbieni sunt produșii principali, se pot corela fazele de multiplicare cu etapele de biosinteză a metaboliților primari și secundari.



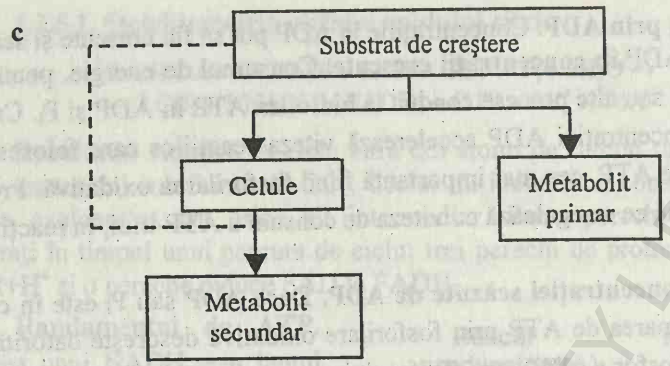


Fig 3.15. Diferenţa dintre metabolismul primar şi secundar: *a* – celulele şi metaboliţii sunt produşi aproximativ simultan; *b* – după formarea celulelor şi metabolitului primar, celulele transformă metabolitul primar în metabolit secundar; *c* – după dezvoltarea celulelor, substratul de creştere rămas este transformat în metabolit secundar.

Metaboliţii primari se formează în faza de creştere logaritmică a microorganismelor, în timp ce *metaboliţii secundari* se formează la sfârşitul fazei de creştere şi, frecvent, la începutul sau în timpul fazei staţionare.

Deosebirea dintre metaboliţii primari şi secundari este redată în fig 3.15.

3.3.1. Metaboliţii microbieni primari

Procesul microbian tipic în care se formează un metabolit primar, în timpul fazei de creştere exponenţiale (log), este *fermentaţia alcoolică.*

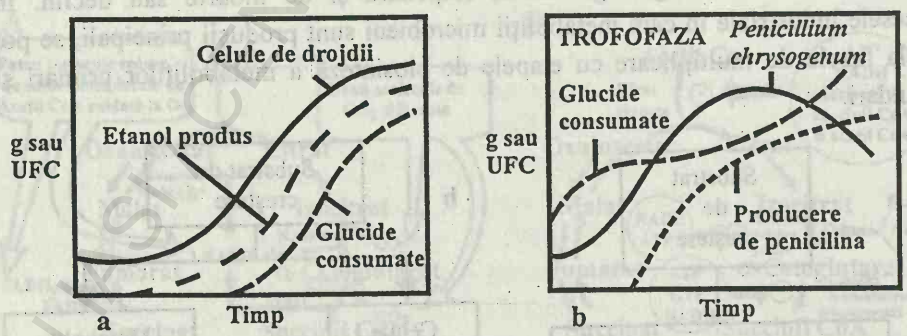


Fig. 3.16. Deosebirile dintre metaboliţii primari şi secundari:
a – metabolism primar: formarea alcoolului cu drojdii; *b* – metabolism secundar: producerea penicilinei cu *Penicillium chrisogenum* demonstrează separarea fazei de creştere (trofofaza) de faza de biosinteză a antibioticului (idiofaza). De subliniat faptul că în (*b*) produsul se formează după ce creşterea a intrat în faza staţionară.

Etanolul este un produs al metabolismului anaerob al drojdiilor, al unor bacterii şi reprezintă în acelaşi timp o parte a metabolismului energetic. Deoarece creşterea poate avea loc numai cu consum de energie, formarea etanolului decurge paralel cu creşterea. În fermentaţia alcoolică tipică (fig.3.16) se formează biomasă şi etanol, concomitent cu consum de sursă de carbon (glucid).

3.3.2. Metaboliţii microbieni secundari

Metaboliţii care se formează la începutul sau în timpul fazei staţionare sunt denumiţi metaboliţi secundari şi sunt cei mai comuni şi importanţi metaboliţi de interes industrial. Cei mai cunoscuţi metaboliţi secundari studiaţi intensiv sunt antibioticele. Figura 3.16, *b* reprezintă cinetica procesului de biosinteză a penicilinei.

În timp ce metabolismul primar este în general asemănător la toate celulele, metabolismul secundar diferă de la un organism la altul.

Caracteristicile metabolismului secundar sunt următoarele:

– fiecare metabolit secundar este sintetizat de un număr mic de microorganisme;

– metabolitul nu pare a fi esenţial pentru creşterea şi înmulţirea microorganismului;

– formarea metabolitului secundar este extrem de dependentă de condiţiile de creştere, în special de compoziţia mediului. Apare frecvent fenomenul de represie a sintezei metabolitului;

– metabolitul secundar sintetizat de microorganism se prezintă sub forma unui amestec de substanţă cu structură chimică înrudită. De exemplu, o tulpină a unei specii de *Streptomyces* produce până la 32 de antracicline înrudite;

– adesea, poate fi obţinută o supraproducţie de metabolit secundar, deşi metaboliţii primari, produşi de metabolismul primar, nu sunt sintetizaţi în cantitate mare.

3.3.3. Trofofaza şi idiofaza

În metabolismul secundar, cele două faze distincte ale metabolismului sunt denumite trofofaza şi idiofaza (fig.3.16, *b*). Trofofaza este faza de creştere (prefixul "trofo" provine din greacă şi înseamnă "creştere"), în timp ce faza în care se sintetizează metabolitul este idiofaza ("idio" prefix care în greacă înseamnă "ceva propriu"). Dacă vrem să obţinem un metabolit secundar, trebuie asigurate condiţii corespunzătoare în timpul trofofazei pentru o creştere bună, urmată apoi de o schimbare a acestora pentru acumularea metabolitului (antibioticului).

În metabolismul secundar, produsul poate să ia naştere dintr-un intermediar format prin transformarea substratului de creştere. Altfel spus, metabolitul secundar este în general format dintr-o suită de produşi intermediari care se acumulează fie în mediul de cultură fie în celulă în timpul metabolismului primar.

Una dintre caracteristicile metaboliţilor secundari constă în aceea că enzimele implicate în metabolismul secundar sunt reglate separat de enzimele metabolismului primar. În unele cazuri au fost identificaţi *inductori ai metabolismului secundar*. De exemplu, a fost identificat un inductor pentru sinteza streptomicinei, un compus denumit Factor A.

3.3.4. Relaţia între metabolismul primar şi secundar

Majoritatea metaboliţilor secundari sunt molecule complexe care necesită pentru sinteza lor prezenţa unui număr mare de reacţii enzimatice.

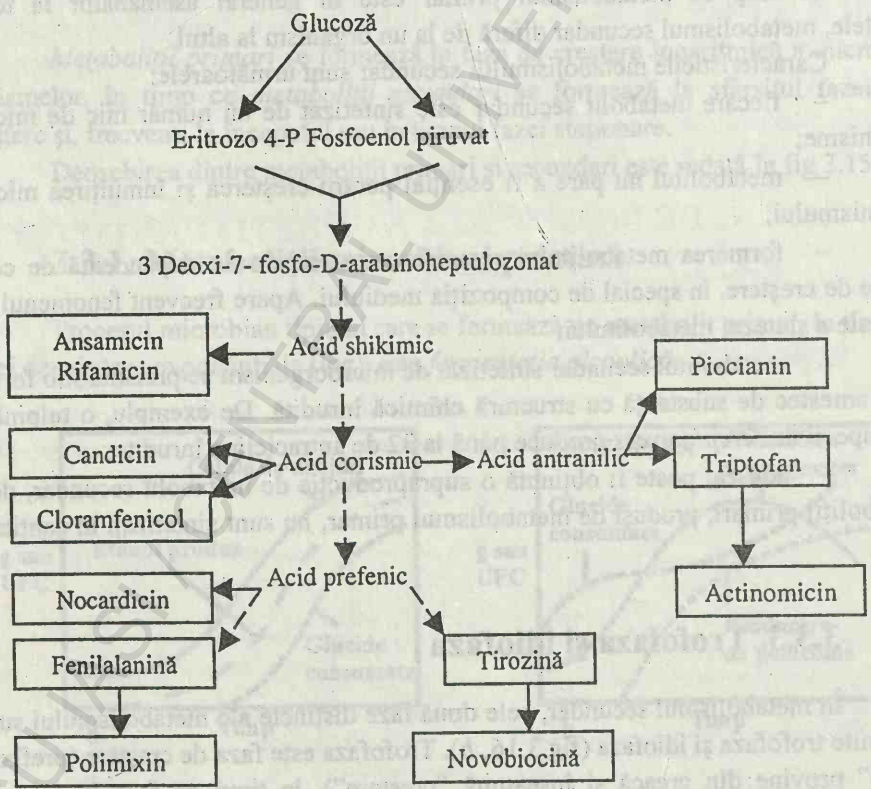


Fig. 3.17. Relaţia dintre calea metabolică primară pentru sinteza aminoacizilor aromatici şi formarea unei serii de metaboliţi secundari conţinând nucleu aromatic.
Notă: este o schemă compozită a proceselor care apar la diferite microorganisme. Nici un microorganism nu sintetizează toţi produşii indicaţi în schemă.

Astfel este cunoscut faptul că în sinteza tetraciclinei sunt implicate cel puţin 72 de etape enzimatice, peste 25 de etape în sinteza eritromicinei, nici una dintre etape nefiind evidenţiate în metabolismul primar. Calea metabolică a metaboliţilor secundari se desfăşoară separat de cea a metabolismului primar, deşi "materialul de plecare" provine din calea metabolică majoră de biosinteză. În figura 3.17 sunt arătate interrelaţiile căii metabolismului primar principal pentru sinteza amino-acizilor aromatici cu metabolismul secundar pentru o serie de antibiotice.

3.4. FERMENTAŢII DERIVATE DIN CĂILE DE BIOSINTEZĂ

3.4.1. Fermentaţii derivate din calea hexozomonofosfatului

Fermentaţia heterolactică. Fermentaţia şi-a căpătat denumirea de heterolactică datorită faptului că în final se obţine, în afară de lactat şi etanol, dioxid de carbon şi eventual acetat. Bacteriile posedă în echipamentul lor enzimatic gliceraldehidfosfat-dehidrogenaza şi sunt lipsite de alte enzime ale ciclului glicolitic şi anume de fructozo-6-fosfatkinaza. Există mai multe sisteme de fermentaţie heterolactică la bacterii:

La *Lactobacillus* şi *Leuconostoc*, în condiţii facultativ anaerobe, are loc fosforilarea xilozei. Pentozofosfo-cetolaza va cliva compusul C5 în acetil P(C2) şi trioz-P(C3). În anaerobioză se formează etanol din acetil-P şi o moleculă de ATP. În aerobioză se formează cantităţi variabile de acetat şi două molecule de ATP.

La *Bifidobacterium*, în afară de acid lactic, se formează acetat. În această cale se găsesc în acelaşi timp etape din calea hexozomonofosfat şi din calea urmată la *Lactobacillus;* este prezentă pentulozofosfat cetolaza. Clivarea fructozo 6-fosfat se realizează prin intermediul fructozo6-fosfocetolazei.

La *Acetobacter (A-xylinum)* şi *Gluconobacter* are loc în condiţii de anaerobioză o fermentaţie acetică derivată din calea hexozomonofosfat.

Fermentaţia gluconică. O mare varietate de microorganisme, în special fungi (*Aspergillus, Penicillium*), precum şi bacteriile *Pseudomonas* şi *Acetobacter* oxidează glucoza la gluconat fără o fosforilare prealabilă, cum este cazul la lactobacilii heterolactici sau microorganisme care folosesc calea Entner-Doudoroff. Glucoza este transformată în gluconolactonă datorită unei oxidări directe cu ajutorul oxigenului. Reacţia este catalizată de glucozoxidază, care are drept co-factor flavinele. Gluconolactona este apoi hidratată în acid gluconic. Produsul de fermentaţie este constituit dintr- un amestec de acid gluconic şi de δ- şi γ-lactone.

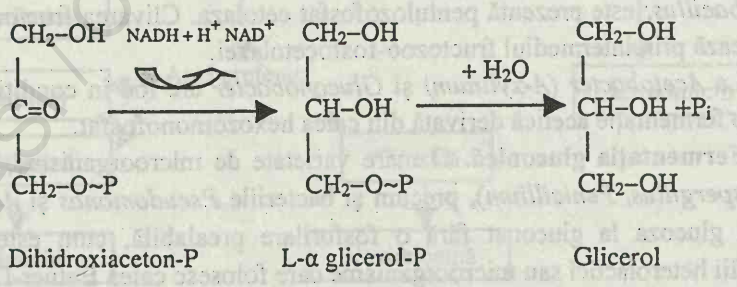
Acidul gluconic este recuperat prin precipitare sub formă de gluconat de calciu. Fermentația necesită o aerație puternică. Gluconatul de calciu este folosit în medicină în carențe de calciu. Glucozoxidaza este folosită pentru eliminarea glucozei din produsele alimentare. Unele bacterii produc în timpul fermentației gluconice diverși acizi oxogluconici.

Fermentația alcoolică. Diferite microorganisme, în special bacteriile strict anaerobe sau facultativ anaerobe metabolizează piruvatul în anaerobioză pe căi diferite. Fermentația alcoolică este răspândită la drojdii (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*), în timp ce bacteriile producătoare de alcool sunt mai puțin numeroase (*Zymomonas mobilis*). Această fermentație este importantă pentru producerea unei game largi de băuturi alcoolice.

Glicoliza reprezintă prima mare etapă a fermentației alcoolice la drojdii. În cazul bacteriei *Zymomonas mobilis*, degradarea glucozei se face pe calea Entner - Doudoroff. Ambele căi duc la formarea acidului piruvic. În timpul fermentației alcoolice, acidul piruvic este decarboxilat în acetaldehidă și CO_2. Reducerea acetaldehidei dă naștere la formarea etanolului. Se pot produce în cantități mici glicerol și acid acetic.

Conversia unei molecule de glucoză în etanol de către drojdii duce la sinteza a 2 molecule de ATP.

În condiții de anaerobioză, drojdiile nu transformă toată glucoza în etanol și CO_2. Se formează cantități mici de piruvat și NADH + H^+, care sunt folosite pentru menținerea viabilității celulare. Reoxidarea NADH + H^+ este necesară pentru finalizarea fermentației alcoolice. Aceasta se realizează prin intermediul reducerii acetaldehidei, care inițial este absentă. În acest caz, dihidroxiacetonfosfatul joacă rolul de acceptor de hidrogen, reconvertindu-se în fosfo 3-glicerat. La rândul său, acesta se transformă în glicerol.



Această secvență constituie fermentația glicero-piruvică, care are loc totdeauna la începutul fermentației alcoolice. Acetaldehida, care poate fi redusă mai ușor decât dihidroxiacetonfosfatul, fixează preferențial hidrogenul la NADH + H^+ și, îndată ce concentrația sa este suficientă, începe derularea normală a căii

Embden-Meyerhoff-Parnas. Aceasta explică prezența constantă a glicerolului în lichidele de fermentație.

Teoretic, fermentația alcoolică ar trebui să permită obținerea unui randament de 51,5 % din glucoza catabolizată. Totuși, chiar dacă anaerobioza nu este favorabilă sintezei constituenților celulari, se observă o oarecare dezvoltare a microorganismelor corespunzând la aproximativ 2% din glucidele utilizate. Pe de altă parte, rezultă că etanolul și CO_2 nu sunt singurii metaboliți formați. Pe lângă glicerol se formează și acizi organici (succinic și acetic), alcooli superiori, aldehide și cetone. Totalitatea acestor componente formează 2,7% din glucidul fermentat. Astfel, cantitatea de etanol produsă este în final de maximum 47–48 %, în greutate, față de glucidul convertit. Deci, se observă că randamentul de conversie a glucozei în etanol se situează între 91 și 95 % din cel teoretic. Variațiile pot fi determinate de cantitatea și calitatea sursei de azot folosite.

În cursul fermentației alcoolice se formează frecvent alcooli superiori, pornind de la dezaminarea aminoacizilor conținuți în mediul de fermentație (valina → izobutanol, leucina → 3-metil butanol, izoleucina → 2-metil butanol, fenilalanina → 2-fenil etanol) și de asemenea a acizilor grași, esterilor, aldehidelor și cetonelor. Acești compuși conferă savoare și aromă produselor de fermentație.

Trebuie subliniat faptul că o serie de glucide sunt fermentate în etanol de către levuri ca, de exemplu:

- *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, care fermentează zaharoza, fructoza, glucoza, maltoza, maltotrioza;
- *Saccharomyces diastaticus*, care fermentează dextrinele;
- *Saccharomyces uvarum*, care fermentează melibioza;
- *Kluyveromyces*, care fermentează lactoza și inulina;
- *Candida* – celobioza;
- *Pachysolem*, *Pichia*, *Candida*, care fermentează xiloza.

Fermentația homolactică. Acidul lactic este produsul esențial al acestei fermentații (peste 90 % din produșii formați).

Acidul lactic ia naștere prin reducerea acidului piruvic catalizat de lactat dehidrogenază; poate să fie sub formă D (*Bacillus coagulans*), sub formă L (*B. laevolacticus*) sau DL (*Bacillus racemilacticus*, *Lactobacillus delbrueckii*). Această producție depinde de stereospecificitatea lactat dehidrogenazei și de prezența sau absența racemazei. Microorganismele pot avea doar L-lactatdehidrogenază sau D lactat dehidrogenază sau ambele enzime. Unele tulpini produc acid racemic, deși posedă lactat dehidrogenază stereospecifică, deoarece racemizarea are loc după formarea acidului lactic optic activ prin intermediul unei racemaze.

Alți producători sunt microorganisme din genurile: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus* și unii fungi (*Phycomycetes*).

Acidul lactic se produce industrial pentru a fi utilizat ca aditiv alimentar.

Fermetațiile homo- și heterolactice intervin, de asemenea, în fabricarea produselor alimentare: brânzeturi, varză murată, saramură de legume, sărătură.

Fermentația heterolactică fungică. Printre fungi, *Rhizopus oryzae* constituie un caz aparte. El produce acid lactic și CO_2 în condiții aerobe și un amestec de acid lactic, etanol și CO_2 în condiții anaerobe. Produșii sunt identici cu cei obținuți în cursul fermentației heterolactice cu *Leuconostoc*, dar mecanismul de formare este diferit: degradarea glucozei se face prin glicoliză. În aerobioză, o parte a piruvatului este transformat în acid lactic, iar cealaltă parte este oxidată. În anaerobioză, o parte a piruvatului este transformată în etanol și CO_2, iar cealaltă parte este transformată în acid lactic. În ambele cazuri acidul lactic este dextrogir.

Fermentația butirică și acetono-butilică. Tulpini din genul *Clostridium* (*C. butyricum, C. perfringens*), *Neisseria și Zymosarcina* produc acid acetic, CO_2 și hidrogen. Acidul butiric se formează prin condensarea a 2 molecule de acetil CoA în acetoacetat, care va fi apoi redus în β-hidroxibutirat și apoi în butirat. O parte din acetil CoA, derivată din piruvat, va forma ATP și acid acetic.

Fermentația propionică. Microorganismele din genul *Propionibacterium*, unele *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, produc prin fermentație acid propionic, acid acetic, CO_2 și uneori acid succinic. Acidul propionic se formează prin reducerea piruvatului (acidul lactic fiind un intermediar), dar el poate fi obținut, de asemenea, prin decarboxilarea acidului succcinic.

Propionibacterium joacă un rol important în tubul digestiv al rumegătoarelor.

Propionibacterium shermanii intervine în fabricarea brânzeturilor.

3.4.2. Fermentații derivate din ciclul Krebs sau șuntul glioxilat

Fermentațiile derivate din ciclul lui Krebs sau șuntul glioxilat sunt fermentații aerobe realizate în principal de fungi. Ele conduc la formarea de acizi organici care sunt metaboliți rezultați direct din ciclul Krebs și șuntul glioxilat sau sunt produși de transformare ai acestora. Produșii se acumulează când ciclul se întrerupe. Această întrerupere poate fi realizată prin variația condițiilor de mediu ca *p*H și prezența inhibitorilor enzimatici, care transformă produsul format. Acumularea poate avea loc și cu ajutorul mutațiilor genelor care controlează aceste enzime.

Punctul de plecare al sintezei acizilor organici din ciclul Krebs este *oxalacetatul*, care este în mod obișnuit reobținut în faza finală a ciclului. Formarea în cantitate mare a acizilor necesită prezența unui aport diferit de acid oxalic, care este format de *ciclurile anaplerotice*.

Embden-Meyerhoff-Parnas. Aceasta explică prezența constantă a glicerolului în lichidele de fermentație.

Teoretic, fermentația alcoolică ar trebui să permită obținerea unui randament de 51,5 % din glucoza catabolizată. Totuși, chiar dacă anaerobioza nu este favorabilă sintezei constituenților celulari, se observă o oarecare dezvoltare a microorganismelor corespunzând la aproximativ 2% din glucidele utilizate. Pe de altă parte, rezultă că etanolul și CO_2 nu sunt singurii metaboliți formați. Pe lângă glicerol se formează și acizi organici (succinic și acetic), alcooli superiori, aldehide și cetone. Totalitatea acestor componente formează 2,7% din glucidul fermentat. Astfel, cantitatea de etanol produsă este în final de maximum 47–48 %, în greutate, față de glucidul convertit. Deci, se observă că randamentul de conversie a glucozei în etanol se situează între 91 și 95 % din cel teoretic. Variațiile pot fi determinate de cantitatea și calitatea sursei de azot folosite.

În cursul fermentației alcoolice se formează frecvent alcooli superiori, pornind de la dezaminarea aminoacizilor conținuți în mediul de fermentație (valina → izobutanol, leucina → 3-metil butanol, izoleucina → 2-metil butanol, fenilalanina → 2-fenil etanol) și de asemenea a acizilor grași, esterilor, aldehidelor și cetonelor. Acești compuși conferă savoare și aromă produselor de fermentație.

Trebuie subliniat faptul că o serie de glucide sunt fermentate în etanol de către levuri ca, de exemplu:

- *Saccharomyces cerevisiae*, *S. carlsbergensis*, care fermentează zaharoza, fructoza, glucoza, maltoza, maltotrioza;
- *Saccharomyces diastaticus*, care fermentează dextrinele;
- *Saccharomyces uvarum*, care fermentează melibioza;
- *Kluyveromyces*, care fermentează lactoza și inulina;
- *Candida* – celobioza;
- *Pachysolem*, *Pichia*, *Candida*, care fermentează xiloza.

Fermentația homolactică. Acidul lactic este produsul esențial al acestei fermentații (peste 90 % din produșii formați).

Acidul lactic ia naștere prin reducerea acidului piruvic catalizat de lactat dehidrogenază; poate să fie sub formă D (*Bacillus coagulans*), sub formă L (*B. laevolacticus*) sau DL (*Bacillus racemilacticus*, *Lactobacillus delbrueckii*). Această producție depinde de stereospecificitatea lactat dehidrogenazei și de prezența sau absența racemazei. Microorganismele pot avea doar L-lactatdehidrogenază sau D lactat dehidrogenază sau ambele enzime. Unele tulpini produc acid racemic, deși posedă lactat dehidrogenază stereospecifică, deoarece racemizarea are loc după formarea acidului lactic optic activ prin intermediul unei racemaze.

Alți producători sunt microorganisme din genurile: *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacillus* și unii fungi (*Phycomycetes*).

Acidul lactic se produce industrial pentru a fi utilizat ca aditiv alimentar.

Fermetațiile homo- și heterolactice intervin, de asemenea, în fabricarea produselor alimentare: brânzeturi, varză murată, saramură de legume, sărătură.

Fermentația heterolactică fungică. Printre fungi, *Rhizopus oryzae* constituie un caz aparte. El produce acid lactic și CO_2 în condiții aerobe și un amestec de acid lactic, etanol și CO_2 în condiții anaerobe. Produșii sunt identici cu cei obținuți în cursul fermentației heterolactice cu *Leuconostoc*, dar mecanismul de formare este diferit: degradarea glucozei se face prin glicoliză. În aerobioză, o parte a piruvatului este transformat în acid lactic, iar cealaltă parte este oxidată. În anaerobioză, o parte a piruvatului este transformată în etanol și CO_2, iar cealaltă parte este transformată în acid lactic. În ambele cazuri acidul lactic este dextrogir.

Fermentația butirică și acetono-butilică. Tulpini din genul *Clostridium* (*C. butyricum, C. perfringens*), *Neisseria și Zymosarcina* produc acid acetic, CO_2 și hidrogen. Acidul butiric se formează prin condensarea a 2 molecule de acetil CoA în acetoacetat, care va fi apoi redus în β-hidroxibutirat și apoi în butirat. O parte din acetil CoA, derivată din piruvat, va forma ATP și acid acetic.

Fermentația propionică. Microorganismele din genul *Propionibacterium*, unele *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, produc prin fermentație acid propionic, acid acetic, CO_2 și uneori acid succinic. Acidul propionic se formează prin reducerea piruvatului (acidul lactic fiind un intermediar), dar el poate fi obținut, de asemenea, prin decarboxilarea acidului succcinic.

Propionibacterium joacă un rol important în tubul digestiv al rumegătoarelor.

Propionibacterium shermanii intervine în fabricarea brânzeturilor.

3.4.2. Fermentații derivate din ciclul Krebs sau șuntul glioxilat

Fermentațiile derivate din ciclul lui Krebs sau șuntul glioxilat sunt fermentații aerobe realizate în principal de fungi. Ele conduc la formarea de acizi organici care sunt metaboliți rezultați direct din ciclul Krebs și șuntul glioxilat sau sunt produși de transformare ai acestora. Produșii se acumulează când ciclul se întrerupe. Această întrerupere poate fi realizată prin variația condițiilor de mediu ca *p*H și prezența inhibitorilor enzimatici, care transformă produsul format. Acumularea poate avea loc și cu ajutorul mutațiilor genelor care controlează aceste enzime.

Punctul de plecare al sintezei acizilor organici din ciclul Krebs este *oxalacetatul*, care este în mod obișnuit reobținut în faza finală a ciclului. Formarea în cantitate mare a acizilor necesită prezența unui aport diferit de acid oxalic, care este format de *ciclurile anaplerotice*.

Oxalacetatul poate fi format:

– din succinat rezultat din şuntul glioxilat: 2 acetat ⟶ 1 succinat;

– prin *carboxilarea piruvatului*, caz în care enzima malică catalizează reacţia de carboxilare ce conduce la malat, care, la rândul său, va fi transformtat în oxalacetat prin intermediul dehidrogenazei:

$CH_3–CO–COO^- + CO_2 + NADPH + H^+ \longleftrightarrow {}^-OOC–CH_2–CHOH–COO^- + NADP^+$

Piruvat — Enzimă malică — Malat

$^-OOC–CH_2–CHOH–COO^- + NAD^+ \longleftrightarrow {}^-OOC–CH_2–CO–COO^- + NADPH + H^+$

Malat — Malatdehidrogenază — Oxalacetat

– prin carboxilarea fosfoenolpiruvatului, precursor al piruvatului:

$CH_2 = C(OPO_3^{2-}) –COO^- + GDP + CO_2 \longleftrightarrow {}^-OOC–CH_2–CO–COO^- + GTP$

Fosfoenolpiruvat — Oxalacetat

Acidul citric. Este folosit în industria alimentară şi farmaceutică ca acidifiant, antioxidant, agent chelator. Este produs de tulpini de *Aspergillus niger* sau *A. wentii* prin următoarele procedee:

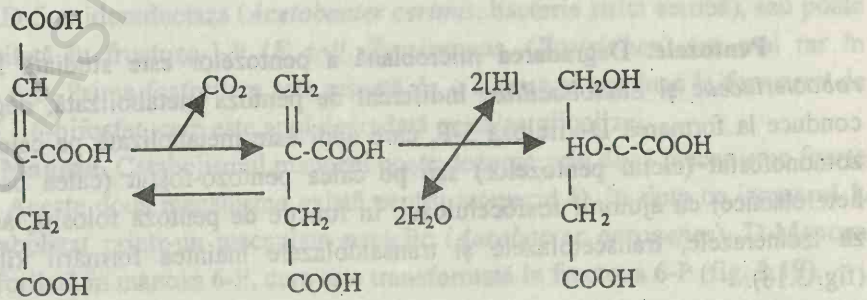
– fermentaţia "Koji", efectuată în Japonia pe tărâţe de grâu umezite;

– fermentaţia în suprafaţă pe medii cu melasă;

– fermentaţia submersă pe medii cu melasă.

Biosinteza acidului citric se realizează fie cu ajutorul mutantelor fie prin modificarea mediului (carenţa indusă de fosfat sau un anumit echilibru în săruri minerale). Fierul este inhibitor, în timp ce cuprul activează biosinteza. În timpul fermentaţiei dispare aconitaza, în timp ce izocitratliaza şi izocitratdehidrogenaza sunt inhibate. În majoritatea cazurilor, fermentaţia are loc în două etape: în prima etapă se formează miceliul, apoi creşterea se opreşte şi are loc acumularea acidului citric.

Acidul itaconic. Este produs de tulpini de *Aspergillus* (*A. itaconicus, A. terreus*). Rezultă din decarboxilarea acidului *cis*-aconitic:



Acid *cis*-aconitic — Acid itaconic — Acid itatartaric

Această reacţie este catalizată de *cis*-aconitat decarboxilaza. Acidul itaconic poate fi descompus în acid itartaric. Acumularea acidului itaconic are loc dacă condiţiile sunt defavorabile acestei transformări: calciul, cuprul, un *p*H scăzut pot bloca enzima care conduce la formarea acidului itartaric. Acidul itaconic este folosit drept copolimer în sinteza răşinilor acrilice şi stirenului.

Acidul fumaric. Este utilizat în industria alimentară şi în industria răşinilor poliesterice, fiind biosintetizat de tulpini *Aspergillus* şi *Rhizopus*. Aeraţia culturilor este esenţială pentru acumularea acidului fumaric. În anaerobioză, principalii produşi de fermentaţie sunt etanolul şi CO_2. Fermentaţia glucozei în prezenţă de $CaCO_3$ conduce la formarea fumaratului de calciu.

Acidul oxalic. Subprodus al fermentaţiei citrice, este produs de diferite tulpini de fungi, în special *Aspergillus niger*. Se obţine prin descompunerea acidului oxaloacetic cu oxaloacetat hidrolază.

$$\underset{\text{Acid oxalilacetic}}{HOOC{-}CH_2{-}CO{-}COOH} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Acid acetic}}{HOOC{-}CH_3} + \underset{\text{Acid oxalic}}{HOOC{-}COOH}$$

Acidul *cis*-aconitic. Este produs de *Aspergillus niger*, din citrat.

$$\text{Citrat} \longleftrightarrow \textit{Cis}\text{-aconitat} \longleftrightarrow \text{Izocitrat}$$

Acidul malic. Se obţine din acid fumaric cu diferite microorganisme: *Leuconostoc*, *Brevibacterium* etc.

Acidul cetoglutaric sau 2-oxoglutaric. Este produs de *Candida lipolitica* sau *Corynebacterium hydrocarboclastus* cultivate pe parafine sau cu *Pseudomonas fluorescens* cultivat pe glucoză.

Acidul succinic. Poate fi obţinut cu *Candida crumptii* cultivată pe parafină.

3.4.3. Degradarea microbiană a altor glucide (decât glucoza)

Pentozele. Degradarea microbiană a pentozelor este studiată la *Enterobacteriaceae* şi *Lactobacillus*. Indiferent de pentoza metabolizată, degradarea conduce la formarea D-xiluloză 5-P, care apoi este metabolizată pe calea hexozomonofosfat (ciclul pentozelor) sau pe calea pentozo-fosfat (calea bacteriilor heterolactice) cu ajutorul fosfocelulozei. În funcţie de pentoza folosită, acţionează izomerazele, transcetolazele şi transaldolazele înaintea formării xilulozo-P (fig. 3.18).

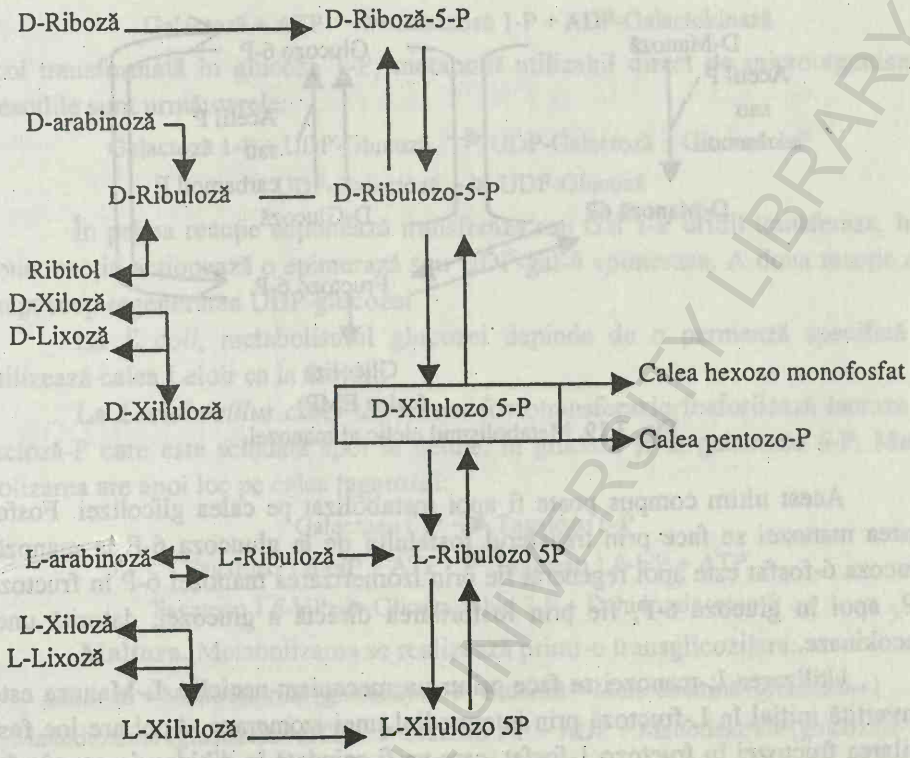


Fig.3.18. Schema generală a metabolismului pentozelor.

La bacterii asimilarea xilulozei se realizează cu ajutorul unei izomeraze:

Xiloză → Xiluloză

în timp ce la drojdii intervine o etapă intermediară:

Xiloză → Xilitol → Xiluloză

Fructoza. Fructoza poate fi oxidată în 5 ceto-D-fructoză de către D-fructoza-NAD-5 oxidoreductaza (*Acetobacter cerinus*, bacterie strict aerobă), sau poate fi fosforilată în fructozo-1-P (*E. coli, Zymomonas, Clostridium*) sau mai rar în fructozo 6-P. Prima fosforilare este urmată de o a doua şi conduce la formarea de fructozo 1,6-bifosfat, care este apoi degradată pe calea glicolizei.

Manoza. Catabolismul manozei poate decurge prin două mecanisme foarte diferite. Aceste două mecanisme există pentru izomerul D, în timp ce izomerul L este catabolizat printr-un mecanism neciclic (*Aerobacter aerogenes*). D-Manoza este fosforilată în manoza 6-P, care este transformată în fructoza 6-P (fig. 3.19).

CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

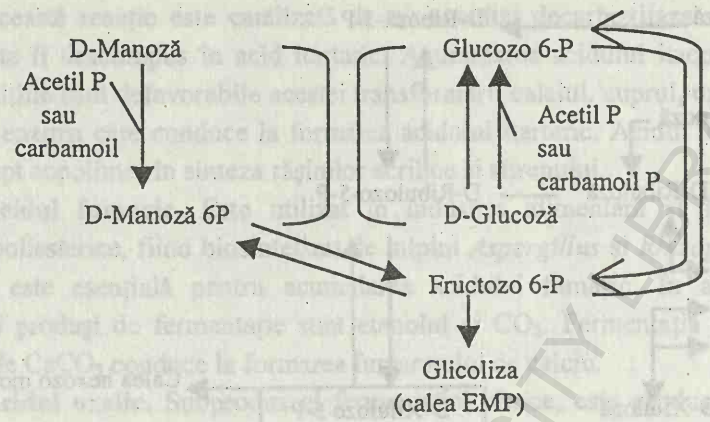


Fig. 3.19. Metabolismul ciclic al manozei.

Acest ultim compus poate fi apoi metabolizat pe calea glicolizei. Fosforilarea manozei se face prin transferul fosfatului de la gluucoza 6-P la manoză. Glucoza 6-fosfat este apoi regenerat fie prin izomerizarea manozei 6-P în fructoza 6-P, apoi în glucoza 6-P, fie prin fosforilarea directă a glucozei, datorită unei glucokinaze.

Utilizarea L-manozei se face printr-un mecanism neciclic. L-Manoza este convertită inițial în L-fructoză prin intermediul unei izomeraze. Apoi are loc fosforilarea fructozei în fructozo 1-fosfat, care va fi scindată în dihidroxiacetonfosfat și în L-gliceraldehidă, a cărei metabolizare se efectuează pe calea glicolizei.

În prima fază a catabolismului intervine invertaza. Această enzimă care hidrolizează zaharoza în glucoză și fructoză este prezentă la numeroase tulpini de drojdii (*Candida utilis, Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Aspergillus niger, Penicillium chrysogenum*) și la diferite bacterii (*Clostridium pasteurianum, Streptococcus*). După clivarea moleculei de zaharoză, glucoza și fructoza sunt degradate prin căile descrise anterior.

Zaharoza este hidrolizată la exteriorul celulelor de drojdii și fungi, în timp ce la bacterii (bacterii lactice, *Bacillus subtilis*) zaharoza este transportată în interiorul celulelor sub formă de zaharoză-P, apoi este hidrolizată:

$$\text{Zaharoză-P} \longrightarrow \text{Glucoză 6-P} + \text{Fructoză}$$

Lactoza și galactoza. Multe microorganisme posedă β-galactozidază. Astfel, dintre levuri, buni producători de β-galactozidază sunt: *Kluyveromyces lactis, K. fragilis, Candida pseudotropicalis* etc; dintre fungi: *Aspergillus niger, A. oryzae* etc.; dintre bacterii: *E. coli, Bacillus stearothermophilus, Lactobaccillus bulgaricus* etc. După hidroliză, glucoza este degradată prin una din căile descrise deja. În ceea ce privește galactoza, ea este degradată în special la drojdii pe calea Leloir-Kalchar. La început este fosforilată:

Galactoză + ATP → Galactoză 1-P + ADP-Galactokinază

apoi transformată în glucoza 1-P, metabolit utilizabil direct de microorganisme. Reacțiile sunt următoarele:

Galactoză 1-P + UDP-Glucoză → UDP-Galactoză + Glucoză 1-P

UDP-Galactoză → UDP-Glucoză

În prima reacție acționează transferaza sau Gal 1-P uridil transferaza, în a doua reacție acționează o epimerază sau UDP-gal-4 epimeraza. A doua reacție are drept scop regenerarea UDP-glucozei.

La *E. coli*, metabolismul glucozei depinde de o permează specifică și utilizează calea Leloir ca la drojdii.

La *Lactobacillus casei* un sistem fosfotransferazic fosforilează lactoza în lactoză-P care este scindată apoi în celule, în glucoză și în galactozo 6-P. Metabolizarea are apoi loc pe calea tagatozei:

Galactozo 6-P → Tagatozo 6-P

Tagatozo 1,6-biP + ATP → Tagatozo 1,6-biP + ATP

Tagatozo 1,6-biP → Gliceraldehid 3-P + Dehidroxiaceton-P

Maltoza. Metabolizarea se realizează printr-o transglicozilare:

Maltoză + Maltodextrină (glucoză)n → Glucoză + Maltodextrină (glucoză)n+1

Maltodextrină (glucoză)x +ATP → Glucozo 1-P + ADP + Maltodextrină (glucoză)x-1

Fosfoamilază

Glucozo 1-P → Glucozo 6-P

Fosfoglucomutază

Metabolizarea în continuare are loc pe căile descrise.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4 CINETICA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ

4.1. DINAMICA MULTIPLICĂRII BACTERIILOR. CURBA DE CREŞTERE

Procesul de creştere a microorganismelor se desfăşoară prin sinteza specifică echilibrată a constituenţilor celulari, pornind de la substanţe nutritive simple aflate în mediul de cultură (Gh. Zarnea).

Procesul de creştere a microorganismelor este controlat genetic. Pe de altă parte, acesta depinde în evoluţia sa şi de natura şi concentraţia substanţelor nutritive în mediu, precum şi de asigurarea cu energia necesară reacţiilor de sinteză. Creşterea bacteriilor se realizează prin depunerea uni- sau tridimensională de substanţă nouă, ceea ce determină mărirea celulei bacteriene în sensul uneia dintre dimensiunile ei sau în sensul celor trei dimensiuni. Mărirea volumului celular se face atât prin sinteza de substanţă organică cât şi prin mărirea conţinutului în apă. Creşterea microorganismelor nu are loc indefinit, ci se întrerupe la un moment dat, când se produce diviziunea celulară.

Activitatea normală a microorganismelor este condiţionată de existenţa unui anumit raport între volumul celulei şi suprafaţa ei, prin care se face absorţia substanţei nutritive şi eliminarea cataboliţilor. În cursul creşterii celulei, raportul suprafaţă/volum se modifică datorită faptului că, în timp ce suprafaţa creşte cu o relaţie pătratică, volumul ei se modifică cu o relaţie cubică, ceea ce determină o diminuare relativă a suprafeţei celulare, fapt ce îngreunează schimbul de substanţe şi, atunci când disproporţia dintre suprafaţă şi volum atinge un anumit punct critic, se produce diviziunea celulară.

În cadrul proceselor biotehnologice, studiul creşterii şi multiplicării microorganismelor producătoare are o importanţă deosebită pentru eficienţa tehnologiilor industriale. Spre deosebire de organismele pluricelulare, la care multiplicarea celulelor duce la mărirea taliei individuale,la toate celelalte organisme unicelulare, ea are ca rezultat creşterea numărului de indivizi. Viteza de multiplicare a

bacteriilor este excepţional de mare. Durata unei generaţii-interval de timp dintre două diviziuni succesive este tipică pentru fiecare specie, dar poate varia la aceeaşi specie în funcţie de condiţiile de mediu, fiind, în general, cuprinsă între 20 şi 30 de minute.

Procesul multiplicării populaţiilor bacteriene este bine cunoscut. Acesta cuprinde mai multe faze (fig.4.1), care sunt descrise în continuare.

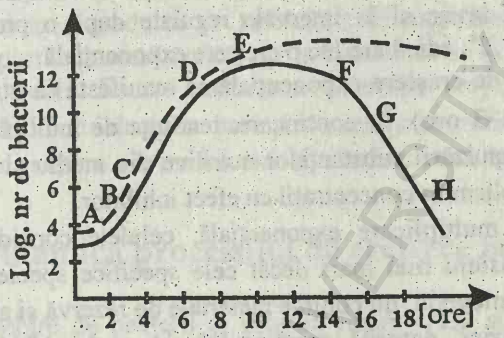


Fig.4.1. Curba de creştere a unei populatii bacteriene (Gh. Zarnea):
A - însămânţare; *A–B* - faza de *lag*; *B–C*- faza de accelerare a ritmului de creştere; *C–D* - faza de multiplicare logaritmică; *D–E* - faze de încetinire a ritmului de creştere; *E–F* - faza staţionară; *F–G* - faza intermediară de declin; *G–H* - faza de declin;
—— număr de celule viabile; – – – număr total de celule din mediul de cultură.

Faza de latenţă sau lag. Este cuprinsă între momentul introducerii germenului în mediul de cultură (inoculare) şi momentul în care celulele acestuia încep să se multiplice. În această fază, numărul bacteriilor din inocul rămâne neschimbat sau chiar scade temporar. Cultura nu este vizibilă macroscopic. Această fază durează în medie câteva ore. Faza de latenţă apare ca o perioadă de adaptare în noile condiţii de cultivare. În această perioadă bacteriile viabile din inocul îşi acumulează în celulă metaboliţii esenţiali şi sistemele enzimatice necesare creşterii.

La transvazarea inoculului într-un mediu nutritiv, se întîlnesc, în principal, două situaţii:

– dacă inoculul bacterian provine dintr-o cultură aflată în curs de multiplicare şi se transvazează într-un mediu nutritiv cu aceeaşi compoziţie, multiplicarea bacteriilor îşi menţine în continuare ritmul rapid (este cazul transvazării inoculului în intermediar, operaţie efectuată numai pentru obţinerea de cantităţi mai mari de inocul necesare fazei următoare de biosinteză numită: fază de regim;

– dacă bacteriile provin dintr-o cultură tot în fază exponenţială de multiplicare dar se transvazează un mediu nutritiv cu altă compoziţie, atunci ele au o perioadă de adaptare, creşterea lor nefiind evidenţiată de la început.

Durata perioadei de latență variază, deci, în funcție de noile condiții de mediu pe care microorganismele le găsesc la transvazare. Cu cât aceste condiții noi (mediu nutritiv, temperatură, *p*H, aerație) sunt mai apropiate de cele anterioare, cu atât perioada de *lag* este mai scurtă.

Faza de multiplicare exponențială sau de creștere logaritmică. Această fază este precedată de o perioadă scurtă (cca 2h) de accelerare a ritmului de creștere, în care multiplicarea se produce cu o viteză progresivă mărită. După această perioadă, diviziunile sunt bine sincronizate, astfel încât numărul celulelor viabile se dublează brusc și la intervale regulate după o progresie geometrică $2, 2^0, 2^1, 2^2, 2^3 \ldots\ldots 2^n$, adică are loc o creștere exponențială.

Capacitatea de creștere exponențială se manifestă ca atare numai o scurtă perioadă de timp (2–3 ore). În continuare, tendința de multiplicare rapidă scade progresiv, datorită epuizării substanțelor nutritive din mediu și acumulării în el a produselor de catabolism în concentrații cu efect inhibitor.

În faza de multiplicare exponențială, celulele considerate a fi de tip embrionar au dimensiuni mai mari decât cele specifice speciei de care aparțin, citoplasma lor este omogenă, nu conține materiale de rezervă și are o mare afinitate pentru coloranții bazici, datorită conținutului ridicat în ARN. Întrucât această perioadă corespunde unor transformări permanente, celulele aflate în faze exponențiale de multiplicare sunt cele mai potrivite pentru lucrări de genetică efectuate în scopul obținerii de noi tulpini producătoare.

Spre sfârșitul fazei de multiplicare logaritmică apare o așa-numită perioadă de post-*lag*, în care are loc un fenomen de încetinire și de sincronizare a creșterii populației bacteriene, celulele aflându-se în stadii diferite ale ciclului lor de dezvoltare. În această perioadă cultura tinde spre un echilibru între diviziune și mortalitate. Din această fază sunt amorsate biosintezele în culturi continue.

Faza staționară maximală. Este faza în care numărul celulelor viabile este maxim și rămâne constant o perioadă de timp care durează de la câteva ore, la câteva zile, în funcție de sensibilitatea bacteriilor la condițiile de mediu.

Intrarea culturii în faza staționară este determinată, de obicei, de epuizarea substanțelor nutritive din mediu sau de acumularea unor produși toxici. În această fază, celulele nu se mai multiplică, iar numărul total al indivizilor populației este constant și egal cu numărul celulelor viabile. În această fază celulele bacteriene sunt considerate mature, având caracteristici morfologice specifice speciei: dimensiuni mai mici decât în faza de creștere exponențială, citoplasma mai puțin omogenă datorită apariției de incluzii și acumulării unor substanțe de rezervă, afinitate normală pentru coloranți și prezența sporilor la speciile sporogene.

Faza de declin. Este faza corespunzătoare unei scăderi progresive a numărului celulelor viabile datorită morții unui număr foarte mare de celule. Celulele din această fază sunt bătrâne, apărând fenomene de involuție: celulele mici, sferice, deformate, gigante sau ramifiacate, care se colorează slab sau capătă

afinitate faţă de coloranţii acizi, iar la speciile sporogene apar foarte mulţi spori. În unele cazuri se produc fenomene de autoliză, ceea ce determină scăderea numărului total de celule din mediu.

Creşterea unui microorganism se poate aprecia prin mai multe metode:

– determinarea substanţei uscate a masei celulare;

– determinarea concentraţiei sursei de carbon din mediu;

– determinarea numărului total de celule, cu ajutorul celulei microscopice de numărat;

– determinarea gradului de turbiditate al suspensiei bacteriene într-un mediu lichid, în raport cu o scară etalon sau la fotocolimetru (D.O.).

De regulă, pentru fiecare bacterie se determină creşterea densităţii optice (D.O.) pe parcursul ciclului de dezvoltare şi se reprezintă grafic în funcţie de timp.

Cinetica de creştere a levurilor este similară cu cea a bacteriilor.

4.1.1. Dinamica procesului de creştere la fungi

Spre deosebire de bacterii şi drojdii, fungii cresc sub formă de colonii, deoarece singurele celule individuale la aceste microorganisme sunt conidiile.

În cazul fungilor, se dezvoltă un miceliu ramificat a cărui lungime poate atinge 10–15 m.

Creşterea unui miceliu pornind de la un inocul de spori sau de la un fragment micelian parcurge mai multe faze:

– *faza iniţială de lag*, care durează câteva ore. În această fază are loc germinarea sporilor (când inocularea s-a efectuat cu suspensie de spori) sau regenerarea hifelor rupte şi lezate (când inocularea s-a efectuat cu inocul vegetativ);

– *faza de creştere liniară*, în care pe suprafaţa mediului apare o colonie circulară, care creşte liniar cu timpul. Ea are forma unei reţele fine de hife ale cărei mărime şi grosime depind de compoziţia mediului nutritiv;

– *faza de învechire*, care corespunde încetinirii vitezei de creştere determinată de efectul dăunător al produşilor de metabolism eliberaţi de colonie.

Încetinirea ritmului de creştere apare mai repede când cultura se dezvoltă pe medii bogate în substanţe nutritive, datorită acumulării mai rapide a produşilor de metabolism.

Creşterea coloniilor de mucegai se poate efectua pe medii solide sau lichide în culturi de suprafaţă sau submerse.

Pe medii lichide, în culturi statice, fungii produc o "pânză" micelială la suprafaţa lichidului. În acest caz, diferitele părţi ale culturii se găsesc în condiţii diferite de mediu şi capacitatea de biosinteză a unui produs este diminuată.

De aceea, în procesele biotehnologice industriale în care este necesară o dezvoltare abundentă şi egală a mucegaiului se utilizează cultivarea submersă, cu agitare mecanică şi aerare corespunzătoare.

4.2. INFLUENȚA FACTORILOR DE MEDIU ASUPRA CREȘTERII MICROORGANISMELOR

Creşterea microorganismelor este influențată de o serie de factori de mediu, dintre care cei mai importanți sunt:

- concentrația substratului;
- calitatea şi cantitatea inoculului;
- temperatura;
- *p*H-ul mediului de biosinteză;
- agitarea;
- concentrația oxigenului dizolvat.

4.2.1. Influența concentrației substratului asupra procesului de biosinteză

Celula microbiană, datorită volumului ei redus, este extrem de sensibilă la variațiile locale ale parametrilor procesului de biosinteză, în special la variațiile concentrației de substrat. Mărirea concentrației de substrat în mediul de cultură poate conduce la sporirea numărului de celule microbiene, dar numai până la anumite limite, multiplicarea acestora fiind încetinită de procese de inhibiție care au loc la nivelul celulei.

Acțiunea unui inhibitor asupra celulei microbiene se poate exercita prin:

- modificarea potențialului chimic al substratului, intermediarilor metabolici sau a produsului finit;
- modificarea permeabilității peretelui celular şi reducerea transportului substanțelor nutritive;
- modificarea activității enzimelor implicate în procesul metabolic;
- disocierea agregatelor metabolice;
- modificarea parametrilor funcționali ai celulei microbiene (capacitatea de multiplicare, mobilitatea, biosinteza unor metaboliți).

Mecanismele prin care se realizează inhibiția sunt:

- reacție chimică cu una sau mai multe componente celulare;
- adsorbția sau complexarea unor enzime sau coenzime;
- intervenția în secvențe a reacțiilor biochimice;
- intervenția în disocierea complexelor enzimatice;

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

– modificarea parametrilor fizico-chimici ai mediului de biosinteză (*p*H, tărie ionică, constantă dielectrică, capacitate de solvatare);

– intervenţia în funcţiile celulare de control.

Datorită acestor fenomene, concentraţii mari de substrat inhibă dezvoltarea microorganismelor într-un anumit grad ajungând chiar la inhibiţie totală. Din acest motiv, pentru un sistem de biosinteză se stabileşte concentraţia optimă a aubstratului atât în momentul iniţial cât şi pe parcurs. De exemplu, pentru foarte multe bacterii, concentraţia de 10–15% în sursă de carbon (glucoză, zaharoză) este inhibitoare, ele dezvoltându-se bine la valori ale sursei de carbon sub 10%.

Acesta este motivul pentru care în soluţii foarte concentrate de zahăr (de exemplu dulceţuri, siropuri) microorganismele, în general, nu se dezvoltă, acestea putând fi conservate pe o lungă perioadă de timp.

4.2.2. Influenţa dimensiunii inoculului

Calitatea şi cantitatea inoculului joacă un rol important pentru obţinerea unor metaboliţi cu randamente dorite de biosinteză. Cel mai adesea se utilizează o cantitate mare de inocul pentru a determina o declanşare rapidă a dezvoltării culturii, concomitent cu reducerea riscului de contaminare.

În majoritatea cazurilor este necesar ca inoculul să se situeze între 3 şi 10% din volumul total al culturii.

Pentru fiecare tehnologie în parte se stabileşte aşa-numitul "raport optim de inoculare", care defineşte cantităţile optime de inocul.

Pentru asigurarea unei productivităţi bune şi pentru măsurarea densităţii inoculului, se extrag probe din cultura aflată într-un anumit stadiu de evoluţie optim pentru obţinerea unei producţii maxime a metabolitului dorit şi se determină parametrii specifici (numărul de germeni pe unitatea de volum, sau conţinutul în biomasă uscată raportată la unitatea de volum).

Efectele determinate de cantitatea şi vârsta inoculului sunt specifice pentru diferite microorganisme.

La bacterii, când se utilizează o cantitate mare de inocul, se micşorează faza de *lag*. Aceasta se datorează formării şi acumulării unor metaboliţi intermediari esenţiali care pot difuza în celule şi în mediul de cultură mai rapid decât în cazul utilizării unui inocul mic. Uneori, însă, cantităţi mari de inocul determină apariţia unui fenomen de autoinhibiţie, datorat sensibilităţii celulelor bacteriene faţă de unii produşi metabolici intermediari.

Când cantitatea de inocul este însă prea mică, faza de *lag* poate fi prelungită la infinit şi aceasta nu poate conduce la o dezvoltare normală a culturii de microorganisme. S-a observat că în cazul bacteriilor, pentru iniţierea dezvoltării unui inocul, este necesară prezenţa în mediul de cultură a unei concentraţii critice

de metale grele. De exemplu, pentru un inocul de *Bacillus subtilis* este necesară prezența în mediul de cultură a unei concentrații minime de mangan, în vederea inițierii dezvoltării. Aceste cercetări subliniază importanța ionilor metalelor grele pentru faza de *lag* la bacterii.

Cantitatea de inocul la bacterii are influență mare asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor în funcție de care variază capacitatea de biosinteză a metabolitului dorit.

În cazul **levurilor,** cantitatea de inocul poate influența, de asemenea, durata fazei de *lag* sau stadiile ulterioare de dezvoltare, similar cu cele descrise în cazul bacteriilor.

În cazul **fungilor,** importanța standardizării inoculului vegetativ pentru acest grup de microorganisme este hotărâtoare. Astfel, pentru obținerea unui ritm rapid de dezvoltare este necesar să se utilizeze un inocul sub formă de suspensie de spori. De asemenea, poate să apară fenomenul de autoinhibiție sau autostimulare a germinării sporilor, datorită prezenței unor substanțe produse în timpul germinării sau în fazele ulterioare. Astfel că, în cazul fungilor, cantitatea de inocul influențează mărimea și forma miceliului precum și randamentul în metaboliți.

Raportul de inoculare trebuie să fie stabilit astfel încât cantitatea de miceliu dezvoltat ulterior să nu fie prea mare în *detrimentul* secreției metabolitului dorit. O dezvoltare abundentă a masei miceliene conduce în același timp la un consum mare de sursă de carbon, cultura fiind astfel ineficientă.

4.2.3. Efectul temperaturii asupra creșterii microorganismelor

Temperatura mediului în care are loc procesul de biosinteză este un factor extrem de important pentru activitatea microorganismelor. Temperatura este un factor care acționează în mod direct asupra microorganismelor vii; diferența între temperatura mediului înconjurător și cea din interiorul celulei trebuie să fie nulă. Pentru un proces de biosinteză industrial, temperatura poate fi considerată unul dintre parametrii fizici cei mai importanți, care este implicat profund, prin efectele sale, în optimizarea procesului.

Variațiile temperaturii au efect asupra randamentului de transformare a substratului în produsul dorit, asupra cerințelor nutritive ale microorganismului și compoziției biomasei obținute precum și asupra vitezei de creștere microbiană.

În funcție de domeniul de temperatură în care microorganismele ating viteza maximă de creștere, acestea se clasifică în: criofile, mezofile și termofile (fig. 4.2). Se observă că fiecare grup de microorganisme are un domeniu de cca 10°C în care viteza de creștere este maximă. Microorganismele industriale sunt, în general, mezofile, astfel încât acest domeniu este plasat în intervalul 25...35°C.

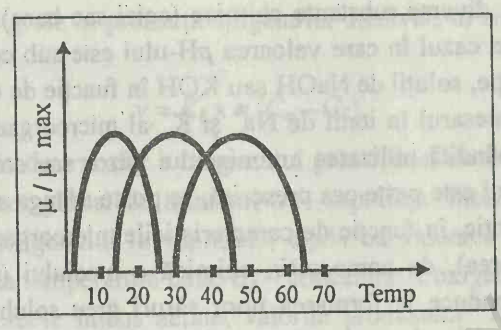


Fig. 4.2. Influenţa temperaturii asupra creşterii microorganismelor (Cooney, 1981).

Efectul temperaturii asupra creşterii microorganismelor se explică prin faptul că aceasta afectează multe procese metabolice din celulă, precum şi compoziţia biomasei în proteine şi lipide, conţinutul în ARN al celulei. Este posibil ca structura lipidică a membranei celulare să se modifice continuu în funcţie de variaţiile de temperatură, astfel încât membrana să-şi menţină funcţia reglatoare.

4.2.4. Efectul *p*H-ului asupra creşterii microorganismelor

Valoarea *p*H-ului este, alături de temperatură, un parametru important în procesele de biosinteză. Influenţa valorii *p*H-ului asupra dezvoltării culturilor microbiene se poate urmări în câteva direcţii:

– în general, microorganismele au un domeniu optim de *p*H pentru dezvoltare, în care viteza specifică de creştere atinge valoarea maximă. De exemplu, pentru anumite specii de drojdii domeniul optim de *p*H se situează între valorile de *p*H 4 şi 5. Există însă şi specii de drojdii care cresc la valori de *p*H în jur de 2 sau, dimpotrivă, la valori ridicate ale *p*H-ului în jur de 8 (de exemplu, biosinteza fenilalaninei cu o drojdie din genul *Rhodotorula*). Cultivările de microorganisme care decurg la valori ale *p*H-ului mai scăzute (*p*H = 3 – 4) prezintă avantajul unui risc mai scăzut de contaminare, ceea ce este apreciat în mod deosebit în cazul unei cultivări industriale;

– efectul valorii *p*H-ului asupra randamentului de conversie a substratului la un anumit produs. Formarea produsului dorit în urma procesului de biosinteză poate să fie legată de desfăşurarea bioprocesului într-un domeniu foarte strict de *p*H. În timpul dezvoltării unei culturi microbiene apar deviaţii ale *p*H-ului de la valoarea considerată optimă, care pot avea urmări nedorite asupra procesului de biosinteză. Aceste modificări se pot datora fie consumării unui nutrient (consumarea sursei de carbon sau consumarea sursei de azot), fie producerii unui acid organic de către microorganism. Pentru corectarea *p*H-ului la valoarea

prescrisă se adaugă diverse substanţe chimice (acizi sau baze) alese în funcţie de mai mulţi factori; în cazul în care valoarea *p*H-ului este sub cea prescrisă, se pot folosi, pentru corecţie, soluţii de NaOH sau KOH în funcţie de compoziţia chimică a mediului şi de necesarul în ionii de Na^+ şi K^+ al microorganismului; în acelaşi scop este mult răspândită utilizarea amoniacului gazos sau soluţie. În situaţia în care valoarea *p*H-ului este peste cea prescrisă, se poate adăuga acid clorhidric, acid sulfuric sau acid azotic, în funcţie de caracteristicile microorganismului (ionul Cl^- să nu inhibe creşterea), de compoziţia chimică a mediului (adăugarea de acid sulfuric ar putea conduce la formarea unor săruri greu solubile), precum şi de materialul de construcţie al vaselor de reacţie şi al bioreactoarelor (probleme de coroziune);

– prin efectul de disociere a acizilor şi bazelor, *p*H-ul acţionează asupra caracteristicilor suprafeţei celulei, modificând proprietăţile ei de aderare la diferite materiale (sticlă, metale) precum şi cele de floculare.

4.2.5. Concentraţia de oxigen dizolvat

În culturile aerobe, este esenţial să se realizeze dizolvarea în mediu a întregii cantităţi de oxigen necesare microorganismului în orice moment al fermentaţiei, prevăzându-se în general un oarecare exces faţă de nevoi. De aceea, se urmăreşte în general obţinerea unor aeraţii cât mai eficiente, transferul de oxigen din faza gazoasă în faza lichidă (mediul de fermentaţie) având loc cu viteze mari.

În cazul în care procesul de biosinteză se desfăşoară în laborator la flacoane agitate, aeraţia depinde de următorii parametri:

– viteza de rotaţie sau translaţie a agitatorului;
– mărimea flacoanelor Erlenmeyer;
– volumul de mediu de cultură din flacon;
– creşterea turbulenţei prin şicane.

Eficienţa aerării unui mediu de cultură este reflectată de concentraţia de oxigen dizolvat. Există mai multe metode de determinare a eficienţei aeraţiei :

– *metoda sulfit*, care permite măsurarea vitezei maxime de transfer a oxigenului din aer în mediu;

– *metoda polarografică* de determinare a concentraţiei oxigenului dizolvat în mediu.

– *utilizarea electrodului cu membrană* pentru măsurarea concentraţiei de O_2 dizolvat şi a consumului de O_2.

– *utilizarea analizorului paramagnetic* de O_2, care analizează compoziţia aerului la ieşirea din bioreactor şi o compară cu compoziţia celui care intră.

Pentru evaluarea cineticii transferului de O_2 se utilizează de cele mai multe ori prima metodă bazată pe oxidarea practic instantanee a sulfitului de sodiu

catalizată de metale grele în prezența oxigenului dizolvat; în acest mod s-a stabilit ecuația:

$$v = K_L \times a\,(C_a - C_L),$$

în care: v este viteza de transfer a oxigenului prin filmul de lichid de la suprafața bulei; K_L – coeficient global de transfer; a – suprafața interfacială gaz – lichid; C_a – concentrația oxigenului la suprafață, egală cu valoarea de saturație pentru sistemul aer – apă, la temperatura dată; C_L – concentrația oxigenului în apă.

Pentru sistemele intens aerate, valorile produsului "$K_L \cdot a$" sunt cuprinse între 70 și 400 mM O_2 absorbit/l oră.

În cazul reactoarelor de biosinteză, aerarea se aplică unui sistem deosebit de complex, conținând numeroase substanțe dizolvate și având o concentrație ridicată de microorganisme suspendate. Alegerea parametrilor sistemului de aerare este determinată de necesitatea furnizării unei cantități de oxigen suficientă pentru a asigura o valoare maximă a activității metabolice în reactoarele de biosinteză; în acest caz, un anumit microorganism și un anumit mediu de cultură se caracterizează printr-o rată de utilizare a oxigenului specifică.

Pentru conducerea unui proces este esențială cunoașterea exactă a modului de variație în timp a necesarului de oxigen și a ratei consumului de oxigen.

Rata consumului de oxigen sporește rapid până la o valoare maximă încă din primele stadii ale procesului de biosinteză, scăzând apoi (fig. 4.3). Valoarea maximă a ratei de consum a oxigenului (O_2) coincide, de obicei, cu momentul atingerii concentrațiilor ridicate de celule la microorganisme. Necesarul de oxigen al culturii este influențat de mediul de biosinteză utilizat. De exemplu, datorită vitezei mari de utilizare a monozaharidelor față de dizaharide, de către *Penicillium*, necesarul de oxigen este dublu la utilizarea glucozei ca sursă de carbon față de zaharoză.

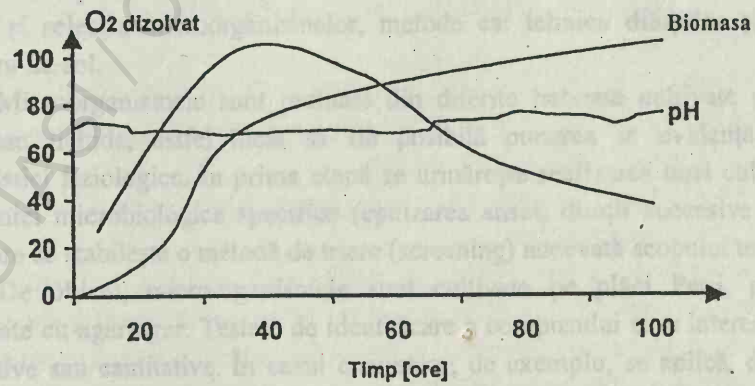


Fig.4.3. Modificarea concentrației de O_2, *p*H-ul și concentrația de biomasă celulară pentru *Myrothecium verrucaria.*

Alți factori care influențează transferul de O_2 sunt :

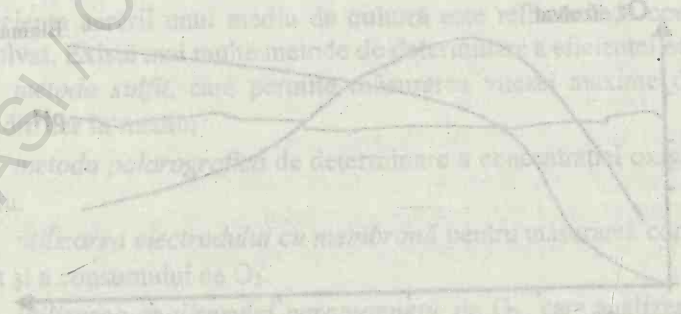
– prezența în mediul de cultură a agenților tensioactivi, care determină o micșorare a coeficienților de transfer;

– concentrația de microorganisme: la concentrații ridicate de microorganisme, vâscozitatea mediului crește, iar eficiența sistemului de aerare scade, bulele tinzând să circule prin canale preferențiale, cu rezistență redusă la înaintare;

– sistemul de agitare al bioreactorului, care influențează sensibil concentrația oxigenului dizolvat, o agitare eficientă a mediului de cultură conducând la o dispersie corespunzătoare a bulelor de aer și, deci, la mărirea coeficientului de transfer al oxigenului;

– echipamentul de aerare utilizat, care permite obținerea unei dispersii uniforme a bulelor de aer: conductele perforate constituie echipamentul preferat pentru reactoarele de biosinteză, de volum mare;

– suprapresiunea, care favorizează mărirea concentrației de oxigen în mediul de cultură, în general procesele biotehnologice fiind conduse la suprapresiuni cuprinse între 0,5 și 1 bar (în scopul micșorării riscului de infecție).



BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5 ETAPELE UNUI PROCES BIOTEHNOLOGIC

Elaborarea şi industrializarea unei tehnologii de biosinteză presupune parcurgerea mai multor faze constând în cercetări la nivel de: laborator, pilot şi industrial. Aceste cercetări permit transpunerea procedeului de biosinteză de la o fază la alta.

5.1. FAZA DE LABORATOR

Cercetările de obţinere a unui produs prin biosinteză încep cu lucrări de laborator care sunt prezentate în cele ce urmează.

Izolarea şi selecţia. Se izolează şi se selectează un mare număr de microorganisme cunoscute din literatura de specialitate ca producători ai compusului ce urmează a fi biosintetizat. Tehnicile utilizate în acest scop sunt specifice pentru fiecare microorganism şi sunt realizate de microbiologi cu pregătire corespunzătoare. Manualele de specialitate indică mai frecvent, pentru izolarea şi selecţia microorganismelor, metode ca: tehnica diluţiilor şi tehnica granulelor de sol.

Microorganismele sunt preluate din diferite habitate cultivate pe medii solide sau lichide, astfel încât să fie posibilă punerea în evidenţă a unor caracteristici fiziologice. În prima etapă se urmăreşte realizarea unei culturi pure prin tehnici microbiologice specifice (epuizarea ansei, diluţii succesive etc.). În continuare se stabileşte o metodă de triere (screening) adecvată scopului urmărit.

De obicei, microorganismele sunt cultivate pe plăci Petri, pe medii solidificate cu agar-agar. Testele de identificare a compusului care interesează pot fi calitative sau cantitative. În cazul enzimelor, de exemplu, se aplică, de obicei, metode de identificare calitativă prin includerea în mediul solid, pe care se cultivă

microorganismele, a substratului specific asupra căruia acţionează enzima ce se doreşte a se sintetiza (amidon în cazul amilazelor, caseină în cazul proteazelor, celuloză în cazul celulazelor). După dezvoltarea coloniilor izolate, enzimele difuzează în gelul de agar-agar, atacând substratul inclus în mediu şi, astfel, zona respectivă poate fi vizualizată, în cazul în care devine transparentă sau cu un reactiv specific.

În cazul altor enzime la care nu se poate aplica un test calitativ, coloniile izolate se cultivă pe medii specifice, iar extractul sau lichidul de biosinteză este preluat şi prelucrat în scopul dozării cantitative a acesteia prin metode spectrofotometrice, fluorescenţă, titrimetrice, polarimetrice. În urma acestor teste se reţin numai câteva tulpini care au dat cele mai bune rezultate în ceea ce priveşte biosinteza enzimei.

Întreţinerea tulpinilor producătoare. După faza de izolare şi selecţie, tulpinile producătoare se supun unor lucrări de caracterizare după criterii morfologice, biochimice, fiziologice, imunologice, toxicologice. Tulpina astfel caracterizată se înregistrează într-o colecţie de microorganisme sub un număr de identificare. De obicei, aceste tulpini sunt supuse unor lucrări de selecţie naturală şi artificială (mutageneză) în scopul obţinerii de tulpini mutante înalt producătoare.

Atât tulpinile parentale cât şi tulpinile mutante sunt conservate prin metode speciale şi păstrate la temperaturi scăzute. Dintre metodele de conservare amintim: liofilizarea şi conservarea în azot lichid.

Tulpinile din colecţie utilizate în lucrările de biosinteză curente se păstrează sub diferite forme, după metode de întreţinere a culturilor, specifice fiecărui microorganism şi formează aşa-numita "cultură stoc" de la care se porneşte procesul de biosinteză.

De obicei, cultura stoc este păstrată la frigider, pe geloză nutritivă, în tub înclinat. Pentru prepararea unei culturi inocul de laborator, se porneşte de la o astfel de cultură vegetativă.

Cultura de inocul. Inoculul reprezintă o cultură microbiană în curs de multiplicare pe un substrat nutritiv corespunzător şi în anumite condiţii specifice de dezvoltare (*p*H, temperatură, agitare, aerare).

Inoculul constituie materialul de însămânţare al mediului de biosinteză propriu-zis, din etapa următoare.

Transvazarea culturii inocul în mediul de biosinteză se realizează în condiţii aseptice, după o perioadă de dezvoltare bine stabilită de către microbiolog (vârstă, cantitate, aspect microscopic). În figura 5.1 poate fi urmărită o instalaţie de laborator ("shake-flask cultures") pentru producerea de enzime existente în cadrul Facultăţii de Biotehnologii, Bucureşti.

Fig.5.1. Instalație de laborator cu flacoane agitate pentru obținerea enzimelor prin fermentație.

5.2. FAZA DE STAȚIE PILOT

Faza de biosinteză propriu-zisă se realizează în aparate speciale, numite bioreactoare de diferite capacități (10 l, 100 l, 1 m^3, 10 m^3, 100 m^3), fiind precedată de operații de sterilizare a aparaturii utilizate și a mediului de cultură stabilit, la nivel de laborator, ca fiind optim. Începutul fazei de biosinteză este considerat momentul transvazării culturii inocul în mediul de cultură sterilizat și răcit la temperatura de cultivare a microorganismului producător. Când raportul între capacitatea de inocul și cantitatea de mediu de fermentație (numit raport de inoculare) nu permite pregătirea culturii inocul în laborator, este necesară introducerea unei trepte intermediare de cultivare, numite "cultură intermediară".

În faza de stație pilot, tehnologia elaborată la nivel de laborator este verificată și optimizată pe instalații de biosinteză de capacitate medie (pilot). În figura 5.2, se poate vedea un echipament micropilot (bioreactor de tip "Biotech Braun" de capacitate 5 l), utilizat pentru producția de enzime (Facultatea de Biotehnologii, București).

Pe baza datelor de cercetare obținute la nivel pilot, se elaborează așa-numitul "proces tehnologic pilot" care urmează o fază de experimentare industrială și apoi producția propriu-zisă de enzimă.

Datele furnizate de tehnologia pilot elaborată constituie elemente de proiectare pentru instalațiile industriale.

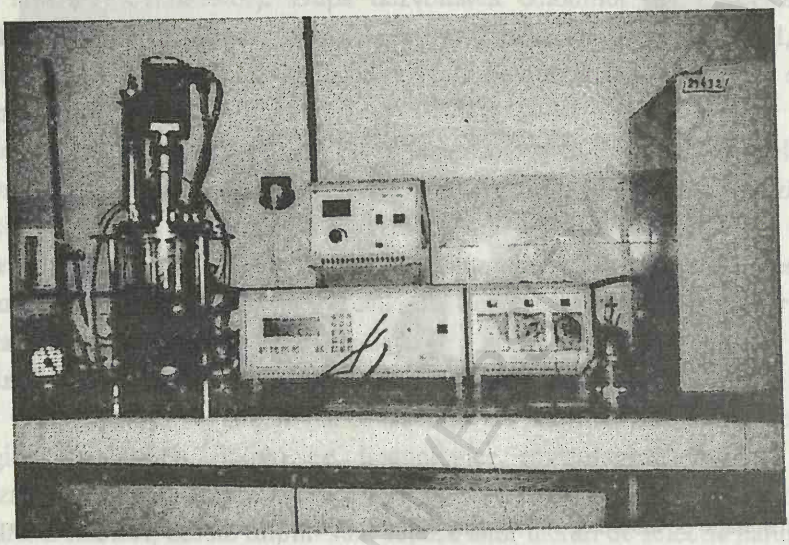


Fig. 5.2. Bioreactor de laborator, pentru obținerea enzimelor prin fermentație.

5.3. MEDII DE CULTURĂ

În procesele biotehnologice, mediile de cultură sunt constituite din suporturi nutritive sterilizate care permit dezvoltarea și studiul unui microorganism, în afara nișei ecologice naturale. Compoziția mediilor de cultură are o mare importanță asupra reproductibilității și eficienței tehnologiei respective.

În funcție de consistență, compoziție, scopul utilizării, mediile de cultură se clasifică astfel:

- după consistență: medii lichide, solide, semisolide;
- după compoziție:
  - medii naturale, care conțin elemente nutritive, de origine vegetală sau animală;
  - medii sintetice, care conțin numai compuși cu structură chimică cunoscută, care pot fi dozați;
- după tipul respirator al microorganismelor cultivate: medii pentru microorganisme aerobe sau anaerobe;
- după scopul și frecvența întrebuințării:
  - medii de uz curent;

– medii speciale utilizate, în general, în studiile de izolare a microorganismelor la nivel de laborator. Acestea pot fi, la rândul lor: elective, selective, de îmbogățire, de conservare, de identificare;

– după faza de biosinteză la care este utilizat mediul de cultură poate fi mediu laborator, pilot sau mediu de cultură industrial;

– după destinația finală a culturii dezvoltate mediile pot fi:

– pentru cultura inocul;

– pentru cultura de regim, numite și medii de fermentație sau medii de biosinteză.

În biotehnologie se utilizează în mod curent mediile naturale având la bază subproduse agroalimentare: șrot de floarea-soarelui, de soia, făină de porumb, tărâțe de grâu, extract de porumb. Aceste medii conțin, în general, elemente nutritive necesare dezvoltării microorganismelor, completându-se de obicei cu cantități mici de săruri minerale.

Mediile naturale sunt, în general, mai ieftine, dar prezintă dezavantajul variabilității compoziției, ceea ce nu permite o standardizare corespunzătoare și, în consecință, nu permite reproducerea procesului de biosinteză cu un randament constant.

Spre deosebire de mediile naturale, mediile sintetice sunt perfect reproductibile la scară industrială.

Un mediu de cultură utilizat pentru dezvoltarea microorganismelor trebuie să conțină întodeauna:

– o sursă de carbon (în general glucide: glucoză,amidon, lactoză, zaharoză etc.);

– o sursă de azot, care poate fi organic (aminoacizi, proteine, uree) sau anorganic (NH_3, $(NH_4)_2SO_4$ etc.);

– o sursă de fosfor (H_3PO_4, $(NH_4)_3PO_4$, KH_2PO_4 etc.);

– oligoelemente: K (din KCl sau K_2HPO_4), Mg (din $MgSO_4$), Fe (din $FeCl_3$);

– microelemente: Mn, Ni, Co, W;

– factori de creștere: aminoacizi, proteine, vitamine, coenzime. Compoziția mediului nutritiv specific pentru un microorganism se stabilește în laborator, prin cultivarea acestuia, alegându-se astfel, în funcție de scopul urmărit, mediul optim de cultivare.

Uneori, pentru creșterea randamentului în faza de biosinteză, se adaugă la mediu precursori care sunt substanțe având porțiuni structurale ale moleculei produsului de biosinteză.

În procesele de biosinteză, sursa principală de energie o constituie sursa de carbon, respectiv glucidele. În procesele catabolice, prin oxidarea biochimică a glucozei se eliberează o mare cantitate de energie, din care o parte este înma-

gazinată în compuşii macroergici (ATP), iar restul este preluat de mediul de cultură cu ajutorul sistemelor de termostatare ale bioreactoarelor. Sursa de carbon furnizează, de asemenea, necesarul de oxigen şi hidrogen în scopul dezvoltării microorganismului.

În 1970, Peppler şi Harrison au demonstrat că există o valoare minimă a concentraţiei elementelor în mediul de cultură, necesară dezvoltării nerestrictive a microorganismului. Mediile de cultură utilizate în bioprocesele microbiene trebuie să conţină elementele esenţiale: carbon, azot, sulf, oxigen, fosfor, magneziu, calciu şi numeroase alte elemente în cantităţi foarte mici (urme): fier, cupru, cobalt, zinc, mangan, molibden, care sunt necesare funcţiilor celulare de bază (Bridson and Brecker, 1970). De cele mai multe ori este însă nevoie să se utilizeze un mediu de cultură cât mai ieftin şi posibil de reprodus o perioadă cât mai lungă de timp. Aceasta conduce la utilizarea unor substraturi cât mai ieftine şi mai accesibile în conjunctura economică respectivă; înlocuirea unui component din compoziţia mediului nutritiv conduce la variaţii în randamentul de producere, astfel încât studiul aprofundat al influenţei diferitelor componente ale mediului de cultură asupra biosintezei constituie un element important al cercetărilor în domeniul biotehnologiei.

Sursa de carbon utilizată în compoziţia mediilor de cultură este suplinită în mod obişnuit de glucide de o anumită puritate sau de un material natural conţinând un amestec de glucide. Astfel, melasa de sfeclă sau de trestie este folosită în multe cazuri drept sursă de zaharoză. Alte surse de carbon utilizate: siropul de glucoză, amidonul de porumb sau de cartofi, hidrolizatul de amidon de cereale (grâu, orez, porumb) sunt în mod frecvent folosite ca surse de glucoză, iar zerul ca sursă de lactoză. Ratledge (1977) a făcut o trecere în revistă a tuturor surselor de carbon posibil de utilizat în industria fermentativă.

Sursa de azot poate fi reprezentată în diferite forme de surse anorganice (amoniacul, sărurile de amoniu) sau amestecuri complexe (extract de drojdie, extract de porumb, peptonă, făină de soia sau distilate solubile). Fosforul, sulful şi cationii esenţiali sunt, în general, suplinişi de sărurile anorganice. Uneori se adaugă elemente specifice în cantităţi mici, dar de obicei acestea sunt aduse de apă sau de alte componente ale mediului. Dintre factorii de creştere, tiamina şi biotina sunt necesare pentru creşterea microorganismelor. Medii tipice utilizate în producţia de enzime bacteriene şi fungice au fost descrise de Aunstrup (1979) şi Lambert (1983).

6 BIOREACTOARE

Principalul scop al biotehnologiei este obţinerea de produse sau servicii utile activităţii umane, cu ajutorul organismelor vii.

Procesul de bază în biotehnologie este "procesul biologic", după cum procesul de bază în tehnologia chimică este "procesul chimic". Spaţiul în care se desfăşoară o reacţie sau un proces chimic se numeşte "reactor chimic". În mod asemănător, spaţiul în care se desfăşoară un proces biologic se numeşte bioreactor.

Deşi procesul de bază din tehnologia de biosinteză este "procesul biologic", el aparţine, totuşi, domeniului ingineriei biochimice, care se ocupă de studiul proceselor de fermentaţie aerobă şi anaerobă, al reacţiilor enzimatice, precum şi de procese specifice industriei fermentative, cum ar fi: sterilizarea, pasteurizarea, liofilizarea, uscarea prin atomizare, izolarea şi purificarea produselor extrase din mediile biologice.

Descoperirile succesive şi dezvoltarea spectaculoasă a biotehnologiei au favorizat atât studiul aprofundat al proceselor implicate, cât şi al aparaturii utilizate, în principal, al bioreactoarelor. S-a născut astfel "bioingineria", care studiază bioprocesele sub toate aspectele (modul de desfăşurare, cinetică, transfer de masă şi căldură), oferind soluţii de optimizare a procesului biotehnologic.

În bioreactor, transformarea materiilor prime este realizată de sistemul enzimatic al microorganismelor vii, al celulelor animale şi vegetale sau de enzimele izolate din acestea. Reuşita experimentului biotehnologic depinde în cea mai mare măsură de condiţiile optime de creştere a microorganismelor create în bioreactor. Celulele se luptă continuu cu modificările din mediul înconjurător, astfel încât să obţină şi să-şi menţină condiţiile optime de creştere. Într-un bioreactor, această tendinţă a celulelor este asistată, este controlată în mod continuu. Reactorul trebuie să asigure aprovizionarea continuă a celulelor cu mijloacele necesare creşterii sau producerii de metaboliţi, asigurând pe cât este posibil valorile optime pentru *p*H, temperatură, concentraţia substratului, concentraţiile în săruri minerale, factorii de creştere şi pentru concentraţia în oxigen.

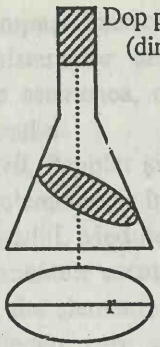


Fig.6.1. Flacon Erlenmeyer agitat:
$2r$ –amplitudinea agitării; volum: 50 – 2000 ml;
grad de umplere: ≤ 20%.

Condiţiile optime pentru tulpinile selecţionate sunt determinate, de regulă experimental. Această determinare se efectuează în laborator, cel mai frecvent în culturi agitate (fig.6.1) (în flacoane Erlenmeyer).

Acestea au dezavantajul că *p*H-ul şi concentraţia oxigenului dizolvat nu pot fi controlate; de obicei, numai temperatura optimă, compoziţia mediului nutritiv şi suplimentarea cu substrat sunt elementele care pot fi determinate şi controlate, prin incubare la termostat şi prelevare de probe la anumite intervale de timp.

Optimizarea *p*H-ului şi a concentraţiei oxigenului dizolvat în mediul de cultură poate fi efectuată în general în bioreactoare de laborator care pot fi prevăzute cu: control al *p*H-ului, agitator şi măsurarea debitului de aer.

În legătură cu reactorul în care trebuie să aibă loc procesul biologic sau biochimic, apar următoarele probleme importante:

– care este cel mai bun reactor pentru o transformare biochimică dată;

– cum se calculează mărimea şi volumul interior util alte elemente constructive al bioreactorului ;

– care sunt condiţiile optime de operare, astfel încât bioreactorul să realizeze performanţele dorite.

Fenomenele care au loc în bioreactor au un caracter complex, datorită interdependenţei fenomenelor de transfer cu cele biochimice. Analiza procesului trebuie să ia în considerare, pe lângă reacţiile biochimice propriu-zise, şi fenomenele fizice cu care acestea interacţionează şi anume: curgerea, transferul de masă şi transferul de căldură, prezente în orice reactor industrial. Descrierea cantitativă a acestor fenomene furnizează ecuaţiile cu ajutorul cărora bioreactorul poate fi analizat, optimizat, dimensionat, reglat.

Procesul biotehnologic industrial poate fi reprezentat schematic printr-o succesiune de trepte de prelucrare fizice şi biochimice (fig.6.2).

Prima treaptă include operaţiile de pregătire şi sterilizare a mediului de cultură, sterilizarea utilajelor şi a aerului tehnologic.

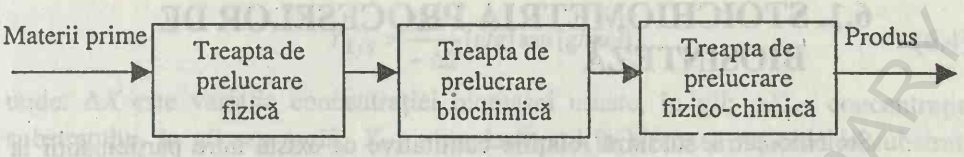


Fig.6.2. Reprezentare schematică a unui proces biotehnologic.

Treapta a doua include, de fapt, biosinteza propriu-zisă, având loc în final obținerea produsului printr-un proces de fermentație aerobă sau anaerobă.

Treapta a treia include operațiile de separare și condiționare a produselor de biosinteză.

Procesul de fabricație conduce la un produs competitiv, dacă se respectă atât condițiile de calitate, cât și de preț. În cazul produselor de fermentație, rațiunile economice conduc la capacități mari de fermentare. Aceasta impune cunoașterea fenomenelor ce au loc în bioreactoarele de capacitate mare. Informațiile obținute la scară mică nu sunt adecvate pentru scară mai mare, întrucât dinamica fluidelor, procesele de transport și chiar comportarea celulelor se schimbă considerabil, când volumul bioreactorului este mai mare.

Pentru a micșora riscul în procesul de realizare la scară industrială a unui proces biotehnologic stabilit în laborator, este necesară construirea unei instalații pilot care să furnizeze informații intermediare și foarte utile pentru proiectul industrial; trecerea de la model la producție poate fi adesea ușurată cu ajutorul teoriei similitudinii. Aceasta stabilește criterii care permit calcularea mărimilor fizice ale sistemului la scară mare, bazat pe rezultatele obținute în modelul experimental, la scară mică. Pentru fiecare proces elementar, factorii determinanți pot fi incluși într-un număr caracteristic, denumit criteriu de similitudine; acesta trebuie să rămână constant pentru ca procesul la nivel industrial să se desfășoare în mod similar cu procesele de laborator și pilot Dacă această similitudine este asigurată, atunci, rezultatele care s-au obținut în laborator sau pilot pot fi utilizate pentru proiectarea reactorului industrial.

Înainte de alegerea modului de operare (discontinuu, continuu, semicontinuu), a tipului, a mărimii și a condițiilor de operare, este necesară o alegere preliminară a tipului de reactor în funcție de microorganismul utilizat, mediul de cultură și de caracteristicile procesului biochimic.Alegerea tipului de bioreactor se efectuează în momentul în care bioprocesul se află încă în faza de cercetare, de obicei în perioada de experimentare la nivel pilot.

6.1. STOICHIOMETRIA PROCESELOR DE BIOSINTEZĂ

Stoichiometria studiază relaţiile cantitative ce există între participanţii la reacţiile chimice (biochimice), cunoscând compoziţia chimică a reactanţilor şi produşilor.

Un bioproces poate fi descris pe baza observării modificărilor macroscopice ce apar datorită dezvoltării culturii, modificări traduse de obicei prin variaţii de *p*H, concentraţii de substrat, celule, produşi de reacţie.

Utilizând randamentele (în raport cu substratul, sau în raport cu produsul), pentru un proces de biosinteză se poate scrie ecuaţia generală:

$$Substrat + O_2 + NH_3 \rightarrow Y_{XIS}\ Biomasa + Y_{XIP}\ Produs + CO_2 + H_2O \qquad (6.1)$$

Dacă se cunoaşte compoziţia chimică elementară a substratului, biomasei şi produsului, ecuaţia anterioară devine:

$$a_1C_xH_yO_z + a_2O_2 + a_3NH_3 + (sursa\ de\ P, K, Mg, Fe...) \rightarrow$$
$$\rightarrow b_1C_sH_tO_uN_v + b_2C_{s'}H_{t'}O_{u'}N_{v'} + b_3CO_2 + b_4H_2O \qquad (6.2)$$

unde: $C_xH_yO_z$ este formula sursei de carbon; $C_sH_tO_uN_v$ – formula biomasei; $C_{s'}H_{t'}O_{u'}N_{v'}$ – formula produsului secundar.

Pentru aplicarea acestei ecuaţii este necesară, în primul rând, cunoaşterea compoziţiei chimice a biomasei şi a produsului secundar pentru a se putea calcula "formulele acestora". După cum se poate observa, în această ecuaţie sunt şase necunoscute (a_1, a_2, b_1, b_2, b_3, b_4), care de obicei se reduc la cinci, deoarece ecuaţiile stoechiometrice se descriu pentru 1 mol de substrat ($a_1 = 1$); a_3 este cunoscut, fiind măsurat la adăugare. Pentru ca sistemul să fie determinat, vom avea nevoie de cinci ecuaţii. Patru dintre acestea se obţin făcând bilanţul celor patru elemente (C, H, O, N), cea de-a cincea necunoscută putând fi determinată fie prin analiză chimică, fie prin calcularea "coeficientului respirator" adică:

$$RQ = \frac{moli\ CO_2\ formaţi}{moli\ O_2\ consumaţi}\ . \qquad (6.3)$$

Aceste ecuaţii sunt utile atât în determinarea consumurilor specifice, cât şi pentru calcularea efectului termic al bioprocesului.

Referitor la randamentul de transformare pentru un bioproces, studiind eficienţa obţinerii biomasei, Monod (1942) a constatat că greutatea celulelor produse a fost proporţională cu cantitatea de sursă de carbon consumată, atâta timp cât aceasta a fost factorul limitativ, toate celelalte componente existând în exces.

Astfel, pentru caracterizarea bioprocesului se poate calcula un randament în biomasă raportat la substrat definit aftfel: cantitatea de substrat consumat pentru obţinerea unui gram sau mol de biomasă:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} [g/g] \text{ sau } [g/mol], \quad (6.4)$$

unde: ΔX este variaţia concentraţiei biomasei uscate, în g/l; ΔS – concentraţia substratului, în g/l sau mol/l; $Y_{X/S}$ – randamentul în biomasă raportat la substrat, în g celule/g substrat sau g celule/mol substrat. Pentru simplificare se notează $Y_{X/S} = Y_S$.

Pentru procesele aerobe, se poate defini prin analogie cu ecuaţia (6.4) un randament în biomasă faţă de oxigenul consumat ($Y_{X/O}$):

$$Y_{X/O} = \frac{\Delta X}{-\Delta O_2} [g/mol], \quad (6.5)$$

în care: ΔO_2 este variaţia concentraţiei oxigenului dizolvat, în mol/l; $Y_{X/O}$ – randamentul bioprocesului raportat la concentraţia oxigenului dizolvat. Pentru simplificare se notează $Y_{X/O} = Y_O$.

Semnul "–" din ecuaţiile (6.4) şi (6.5) semnifică faptul că într-un proces de biosinteză atât concentraţia substratului cât şi a oxigenului descresc în timp.

6.2. MODELE MATEMATICE ALE CREŞTERII MICROBIENE. ECUAŢIA MONOD

Creşterea microorganismeleor este un fenomen foarte complex, datorită numărului mare de reacţii implicate şi a interdependenţei dintre ele. Este foarte dificil să se stabilească un model matematic care să cuprindă toate reacţiile biologice şi efectele fiziologice determinate de mediu. Din acest motiv, modelele propuse pentru bioprocese conţin, de fapt, ecuaţii de bază ale creşterii microorganismelor. Acestea au fost deduse în condiţii ideale, în care toţi nutrienţii necesari pentru o creştere echilibrată sunt prezenţi în exces.

De asemenea, s-a plecat de la următoarele ipoteze:

– s-a considerat că microorganismul, în dezvoltarea sa, urmează aceeaşi cale de diviziune celulară şi anume: celula creşte în mărime până la un punct, după care celula parentală se scindează în două celule-fiice identice. Această ipoteză nu ţine cont de faptul că la drojdii, de exemplu, fenomenul de înmulţire are loc prin înmugurire. Deci, se pleacă de la ipoteza următoare: calea pe care o urmează dezvoltarea unei populaţii va fi aceeaşi, indiferent de modul de organizare şi de structura organismului viu;

– se presupune că se menţin condiţiile ideale şi deci că produşii de metabolism nu vor modifica condiţiile fizico-chimice predominante ale mediului

înconjurător (ceea ce în realitate este valabil doar la începutul fazei de creştere a microorganismului);

– se presupune că toate celulele vor consuma nutrienţii disponibili şi vor creşte în mărime exact cu aceeaşi viteză.

Procesul de biosinteză, în general, a fost studiat de mulţi cercetători, care au încercat să elaboreze diferite modele matematice, în scopul reprezentării cât mai apropiate de realitate, a cineticii de desfăşurare acestuia. Astfel de modele au fost elaborate, de exemplu, de Monod, Komo, Verhoft.

Ecuaţia Monod. Monod este primul care a descris variaţia în timp a concentraţiei (X) de celule microbiene din mediul de biosinteză, stabilind o relaţie între concentraţia substratului limitativ şi viteza specifică de creştere. El a adaptat ecuaţia Michaelis-Menten, din cinetica enzimatică, la creşterea microorganismelor şi a stabilit ecuaţia generală:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X , \qquad (6.6)$$

valabilă pentru cazul în care nutrienţii sunt prezenţi în cantităţi nelimitate, în care: X este concentraţia de celule microbiene din mediul de biosinteză, în $g \cdot l^{-1}$ (concentraţia în biomasă); t – timpul de dezvoltare (cultivare), în h; μ – viteza specifică de creştere, în h^{-1}.

Astfel de condiţii pot exista doar pentru perioade scurte de timp (la începutul unei cultivări în şarjă, de exemplu, când nutrienţii sunt în exces).

Pentru faza exponenţială, dacă integrăm ecuaţia (6.6) între următoarele limite: 0 şi t pentru timp şi între X_0 şi X pentru concentraţia de celule, obţinem:

$$\int_{X_0}^{X} \frac{dX}{X} = \int_0^t \mu \cdot dt ;$$

$$\ln X - \ln X_0 = \mu \cdot t ;$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu \cdot t ;$$

$$X = X_0 \cdot e^{\mu \cdot t} , \qquad (6.7)$$

în care X_0 este valoarea concentraţiei de celule la timpul $t = 0$.

Monod consideră că viteza specifică de dezvoltare, în cursul unui proces de biosinteză, depinde de concentraţia (C) a unui component din mediul de cultură, cu rol limitativ.Variaţia vitezei specifice de dezvoltare respectă în acest caz cinetica Michaelis-Menten:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C}{K + C} , \qquad (6.8)$$

în care: μ_{max} este viteza specifică de dezvoltare maximă, în h^{-1}; μ – viteza specifică

de creştere, în h^{-1}; C – concentraţia componentului limitativ, în g/l; K – constantă de saturare care este echivalentă cu valoarea lui C la care viteza de creştere este egală cu $\mu_{max}/2$, în g/l.

Ecuaţia (6.8) este reprezentată grafic în fig. 6.3.

Componentul limitativ din mediul de biosinteză poate fi: sursa de carbon (de exemplu, glucoza), sursa de azot (de exemplu, un aminoacid esenţial din mediul de cultură), sursa de fosfor anorganic sau oxigenul.

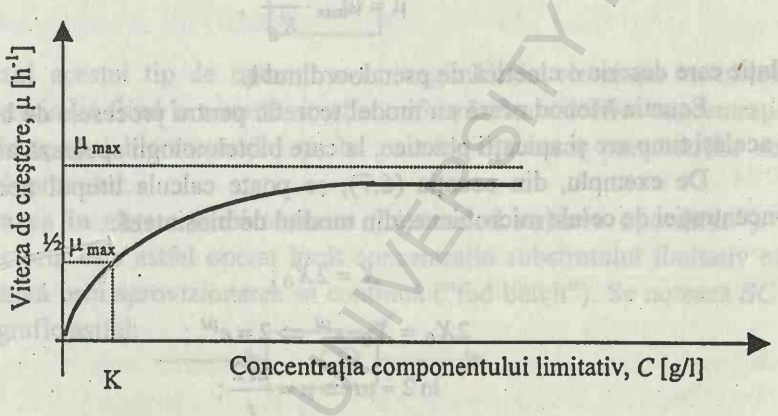


Fig.6.3. Dependenţa vitezei specifice de creştere de concentraţia componentului limitativ din mediul de cultură.

Când componentul limitativ este un nutrient, atunci el se numeşte substrat limitativ iar concentraţia sa se notează cu S; în acest caz ecuaţia (6.8) devine:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}, \tag{6.9}$$

în care: S este concentraţia substratului limitativ; K_S – constanta de saturare cu substrat (constanta Monod).

În cazul în care componentul limitativ este oxigenul, relaţia (6.8) devine:

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}, \tag{6.10}$$

în care: C_{O_2} este concentraţia în oxigen dizolvat; K_{O_2} – constanta de saturare în oxigen.

Constanta de saturare este o măsură a afinităţii organismului pentru substratul limitativ; o valoare mai mică a lui K_S înseamnă o afinitate mai mare pentru substratul limitativ şi, deci, o capacitate mai mare de a creşte rapid la concentraţii scăzute de substrat limitativ.

Pe baza ecuației (6.9) se pot determina valorile vitezelor specifice de creștere μ pentru cazurile extreme ale unor concentrații foarte mari și respectiv foarte mici de substrat astfel:

– la concentrații mari de substrat ($S>>K_S$) ecuația (6.9) devine:

$$\mu = \mu_{max}, \tag{6.11}$$

descriind o comportare de pseudoordinul zero;

– la concentrații mici de substrat ($S<<K_S$), ecuația (6.9) se transformă în:

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S}, \tag{6.12}$$

relație care descrie o cinetică de pseudoordinul I.

Ecuatia Monod oferă un model teoretic pentru procesele de biosinteză, dar în același timp are și apicații practice, la care biotehnologii apelează adesea.

De exemplu, din ecuația (6.7), se poate calcula timpul necesar dublării concentrației de celule microbiene, din mediul de biosinteză:

$$X = 2X_0;$$

$$2X_0 = X_0 \cdot e^{\mu t} \Rightarrow 2 = e^{\mu t};$$

$$\ln 2 = \mu t \Rightarrow \mu = \frac{\ln 2}{t}; \tag{6.13}$$

$$\mu = \frac{0{,}693}{t} \Rightarrow t = \frac{0{,}693}{\mu}.$$

Determinând experimental viteza specifică de creștere μ, se poate calcula ușor timpul necesar obținerii unei anumite cantități de biomasă într-un proces de biosinteză dat.

6.3. CONCEPTE DE BAZĂ ÎN OPERAREA BIOREACTOARELOR

Există două sisteme majore de cultivare a microorganismelor care s-au impus cu timpul în domeniul biotehnologiei:

– în sistem submers;

– în culturi de suprafață.

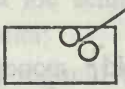
În cazul cultivării microorganismelor în sistem submers, mediul de cultură este lichid, agitat și aerat; din punct de vedere al continuității procesului, se disting trei moduri de operare: discontinuu, semicontinuu și continuu.

Operarea în sistem discontinuu, adică în șarje (sistem batch). Cultivarea începe la timpul $t = 0$ și se termină la timpul $t = t'$. La început, proliferarea

celulelor are loc în condiţii nelimitative. După ce s-a atins densitatea maximă în celule are loc operarea în condiţii limitative de substrat. Substratul se referă la unul dintre nutrienţi (sursa de carbon, sursa de azot etc.) sau la oxigen.

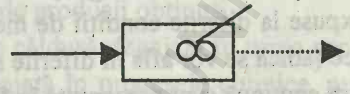
În particular, pentru oxigen, care este consumat foarte rapid, o aprovizionare continuă în mediu este posibilă, astfel încât concentraţia sa să nu scadă sub o valoare critică specifică microorganismului.

Operarea în sistem discontinuu se notează *DC*, fiind reprezentată grafic astfel:



În cazul acestui tip de operare avem regimul de circulaţie amestecare perfectă, caracteristică fiind în această situaţie uniformitatea valorilor concentraţiei, temperaturii în spaţiul bioreactorului şi, în general, a tuturor parametrilor care influenţeaza bioprocesul.

Operarea în sistem semicontinuu ("extended culture operation"). În acest caz, reactorul este astfel operat încât concentraţia substratului limitativ este păstrată constantă prin aprovizionarea sa continuă ("fed batch"). Se notează *SC* şi se reprezintă grafic astfel:



Operarea în sistem continuu ("continuous operation"). Aceasta presupune alimentarea continuă cu nutrienţi şi în acelaşi timp evacuarea din reactor a unei cantităţi echivalente de mediu de cultură.

Cultivarea continuă poate fi realizată în două tipuri de reactoare ideale: *R* şi *D*. Pentru reactorul *R* (cu recirculaţie) se impune amestecare perfectă, deci un grad foarte mare de omogenitate, iar în cazul reactorului *D* (cu deplasare) se consideră o curgere tip piston (fig.6.4).

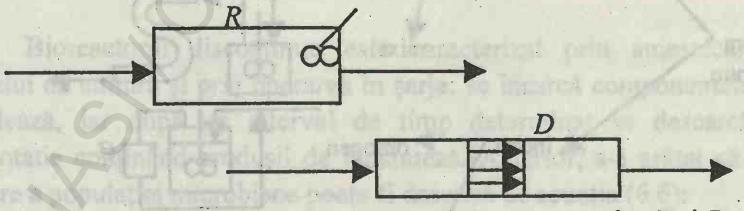


Fig.6.4. Reprezentarea schematică a reactoarelor *R* şi *D*.

În modelul cu deplasare ideală, *D*, elementele dintr-o secţiune transversală, o dată intrate în reactor, se deplasează prin translaţie în direcţie axială prin reactor; nu există elemente de fluid care să depăşească alte elemente de fluid. Cantitativ, acest model se exprimă prin constanţa vitezei fluidului în secţiunea transversală.

În biotehnologie, există însă şi sistemul de cultivare a microorganismelor în culturi de suprafaţă în care mediul de cultură poate fi solid sau semisolid, astfel încât, dacă se ţine seama de omogenitatea fazelor se poate face o clasificare a bioreactoarelor în:

- omogene: $L-L$
- heterogene $\begin{cases} L-S \\ G-L-S \end{cases}$

unde:

- $L-L$: lichid – lichid } monofazice
- $L-S$: lichid – solid } multifazice
- $G-L-S$: gaz – lichid – solid

În sistemele omogene, compoziţia mediului de fermentaţie este uniformă pe tot parcursul bioprocesului. În sistemele heterogene, în mediul de fermentaţie există gradiente de celule sau de substrat. În sistemul omogen, în orice moment, microorganismele din diferite zone ale sistemului au aceeaşi stare fiziologică (acelaşi stadiu de dezvoltare). În sistemul heterogen, microorganismele din diferite zone ale sistemului sunt expuse la diferite condiţii de mediu şi, în consecinţă, vor avea diferite stări fiziologice (adică se vor afla în diferite stadii de dezvoltare).

Sistemele de operare continuă sunt prezentate în fig.6.5.

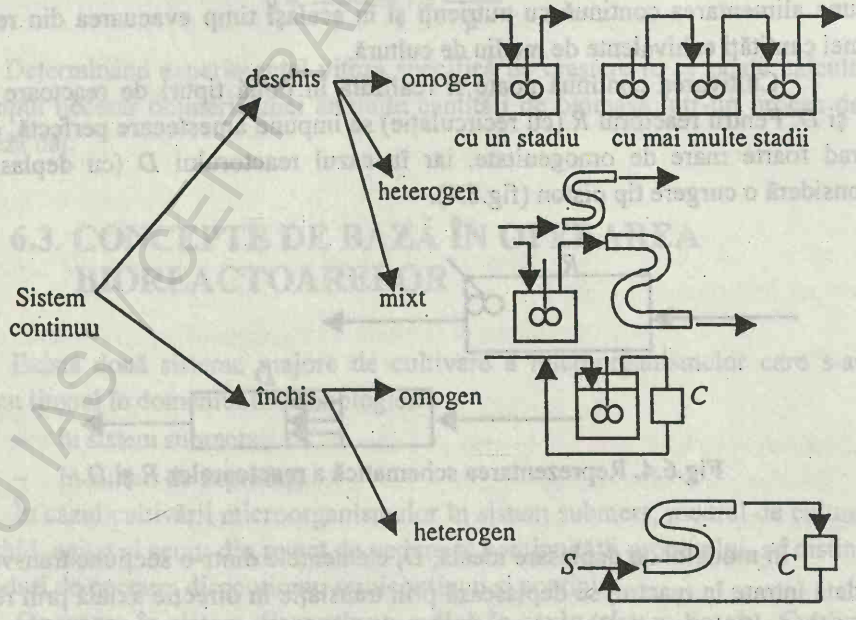


Fig.6.5. Sisteme de operare continuă:
S-substrat; *C*-celule.

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

Un alt criteriu care stă la baza clasificării bioreactoarelor este regimul termic.

Pentru reactoarele chimice, se pot practica următoarele regimuri:

– izoterm: au loc schimburi de căldură cu exteriorul, temperatura rămânând constantă;

– adiabat: nu au loc schimburi de căldură cu exteriorul;

– neizoterm-neadiabat: au loc schimburi de căldură cu exteriorul, iar temperatura în reactor nu este constantă;

– programat: se modifică regimul termic, astfel încât să se atingă un optim dorit;

– autoterm: reactorul se susţine singur din punct de vedere termic.

Reacţiile chimice pot fi exoterme, cu degajare de căldură ($\Delta I_R < 0$) sau endoterme, cu absorbţie de căldură din mediul exterior ($\Delta I_R > 0$). Reacţiile chimice exoterme pot fi conduse în oricare din regimurile termice specificate, pe când cele endoterme nu pot fi operate autoterm.

Reacţiile biologice sunt exoterme, indiferent de microorganismul utilizat, de condiţiile de lucru sau de produşii obţinuţi.

Deşi cantitatea de căldură degajată în urma proceselor biologice este mică în comparaţie cu cea degajată în procesele chimice, nu trebuie neglijată deoarece materialul biologic (microorganisme, enzime) este foarte sensibil la variaţiile de temperatură.

6.4. CARACTERIZAREA BIOREACTOARELOR

6.4.1. Bioreactorul discontinuu

Bioreactorul discontinuu este caracterizat prin amestecarea ideală a mediului de cultură şi prin operarea în şarje: se încarcă componentele mediului,se inoculează, iar după un interval de timp determinat se descarcă mediul de fermentatie conţinând produşii de biosinteză. Anterior, s-a arătat că dinamica de creştere a populaţiei microbiene poate fi descrisă de ecuaţia (6.6):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

iar variaţia concentraţiei substratului, prin relaţia:

$$Y_S = \frac{\Delta X}{-\Delta S};$$

$$\Delta X = Y_S \cdot \Delta S;$$

$$X - X_0 = Y_S \cdot (S_0 - S);$$

$$S = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_S}. \tag{6.14}$$

Dacă pentru *viteza specifică de creştere* admitem o cinetică de tip Monod:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S}.$$

Prin înlocuirea lui μ, în ecuaţia 6.6 se obţine:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S} \cdot X \tag{6.15}$$

sau, prin integrare între limitele de timp t şi t_0, rezultă:

$$\int_{X_0}^{X} \frac{K_S + S}{\mu_{max} \cdot X \cdot S} dX = \int_0^t dt. \tag{6.16}$$

Atunci, timpul necesar obţinerii unei concentraţii celulare X se poate calcula astfel:

$$t - t_0 = \frac{1}{\mu_{max}} \int_{X_0}^{X} \left(\frac{K_S}{S \cdot X} + \frac{1}{X} \right) dX. \tag{6.17}$$

În cazul particular, când S este mult mai mare decât K_S, $\frac{S}{S + K_S} \to 1$ şi atunci se obţine:

$$t = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{X}{X_0}. \tag{6.18}$$

Determinarea duratei reacţiei pentru cazul general se poate face şi grafic, dacă se reprezintă datele experimentale ca $\frac{1}{\Delta X / \Delta t} = f(X)$ şi se planimetrează suprafaţa de sub curbă.

În cazul bioreactorului discontinuu *consumul de substrat* se defineşte cu relaţia:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{1}{Y_S} \cdot \frac{dX}{dt} \tag{6.19}$$

întrucât randamentul a fost definit anterior prin relatia (6.4):

$$Y_S = \frac{\Delta X}{-\Delta S}.$$

Înlocuind în relatia (6.19): $\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$, conform ecuaţiei Monod (6.6) obţinem:

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$-\frac{dS}{dt}=\frac{1}{Y_S}\mu\cdot X. \tag{6.20}$$

Productivitatea în celule este:

$$PR=\frac{dX}{dt}=\mu\cdot X. \tag{6.21}$$

Aceste relații sunt valabile când nutrienții sunt în cantități nelimitate.

Când *substratul este limitat*, avem relațiile:

– *viteza de creștere*:

$$\mu=\mu_{max}\cdot\frac{S}{K_S+S}; \tag{6.22}$$

– *consumul de substrat*:

$$-\frac{dS}{dt}=\frac{1}{Y_S}\cdot\mu_{max}\cdot\frac{S}{K_S+S}\cdot X; \tag{6.23}$$

– *productivitatea*:

$$PR=\mu_{max}\frac{S}{K_S+S}\cdot X. \tag{6.24}$$

În condițiile *limitării concentrației de oxigen dizolvat* avem relațiile:

– *viteza de creștere*:

$$\mu=\mu_{max}\cdot\frac{C_{O_2}}{K_{O_2}+C_{O_2}};$$

– *consumul de* O_2:

$$-\frac{dC_{O_2}}{dt}=\frac{1}{Y_0}\cdot\mu_{max}\cdot\frac{C_{O_2}}{K_{O_2}+C_{O_2}}\cdot X;$$

– *productivitatea*:

$$PR=\mu\cdot X=\mu_{max}\frac{C_{O_2}}{K_{O_2}+C_{O_2}}\cdot X.$$

În cazul cultivării microorganismelor în sistem discontinuu (șarjă), pe măsura creșterii populației, mediul de cultură își modifică compoziția atât datorită consumării nutrienților, cât și datorită formării unor produși secundari ce se acumulează în sistem.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.4.2. Bioreactorul continuu

În cazul cultivării continue, prelungirea fazei de creştere exponenţială un timp nedefinit se realizează prin adăugarea continuă în reactor a unei soluţii de mediu proaspăt cu un debit volumetric F şi eliminarea continuă a biomasei cu acelaşi debit, astfel încât volumul biomasei din fermentator să rămână constant.

Pentru stabilirea ecuaţiei ce generează dezvoltarea microorganismelor, trebuie să se ţină seama de faptul că variaţia concentraţiei biomasei este datorată existenţei a două fenomene antagoniste:

- creşterea numărului microorganismelor datorită dezvoltării populaţiei;
- scăderea cantităţii de microorganisme datorită eliminării lor din sistem.

Ecuaţia de bilanţ pentru biomasă este:

Biomasă alimentată + Biomasă existentă + Biomasă generată = Biomasă rămasă + + Biomasă ieşită cu efluentul.

Deoarece în acest caz se alimentează doar mediu de cultură (fără celule), primul termen este zero.

Calculând bilanţul pentru un interval de timp mic Δt, dacă concentraţia biomasei este X la momentul t, atunci la momentul $t + \Delta t$ ea va avea valoarea:

$$X + \Delta X .$$

Ştiind că masa celulelor se obţine prin înmulţirea concentraţiei lor cu volumul de lucru (presupus constant), ceilalţi termeni se calculează astfel:

- biomasă existentă:

$$X \cdot V \qquad \left[\frac{g}{l} \cdot l\right] = [g];$$

- biomasă generată în intervalul Δt

$$\mu \cdot X \cdot V \cdot \Delta t \qquad \left[\frac{1}{ч} \cdot \frac{g}{l} \cdot ч \cdot l\right] = [g];$$

- biomasă rămasă în reactor la momentul $t + \Delta t$, care are concentraţia $X + \Delta X$:

$$(X + \Delta X) \cdot V \qquad \left[\frac{g}{l} \cdot l\right] = [g];$$

- biomasă ieşită în intervalul Δt:

$$(X + \Delta X) \cdot \Delta t \cdot F \qquad \left[\frac{g}{l} \cdot ч \cdot \frac{l}{ч}\right] = [g],$$

unde F este debitul volumetric.

Introducând termenii explicitaţi în ecuaţia de bilanţ, se obţine:

$$X \cdot V + \mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V = (X + \Delta X) \cdot V + (X + \Delta X)\Delta t \cdot F .$$

Reducând termenii din această relaţie, se obţine:

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

$$\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V = \Delta X \cdot V + \underbrace{\Delta X \cdot \Delta t \cdot F}_{0 - \text{pentru că e foarte mic}} + F \cdot X \cdot \Delta t \ ,$$

Considerând că diferenţele finite Δt şi respectiv ΔX devin foarte mici tinzând către diferenţe infinitezimale, se poate considera că produsul $(\Delta X \cdot \Delta t)$ devine extrem de mic şi deci poate fi neglijat în raport cu ceilalţi termeni, astfel încât se poate scrie:

$$\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V = \Delta X \cdot V + X \cdot \Delta t + F \cdot X \cdot \Delta t \ ;$$

Împărţind prin $(V\Delta t)$ se obţine:

$$\mu \cdot X \frac{\Delta X}{\Delta t} + \frac{F \cdot X \cdot \Delta t}{V \cdot \Delta t} \ ;$$

Trecând la diferenţe infinitezimale, se obţine ecuaţia diferenţială:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - \frac{F}{V} \cdot X$$

Notând cu $\frac{F}{V} = D \left[h^{-1} \right]$ viteza de diluţie va fi:

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \ . \qquad (6.25)$$

Viteza de diluţie D reprezintă numărul de volume reînnoite ale reactorului (alimentate şi evacuate) în unitatea de timp (de exemplu, într-o oră). Astfel, dacă $\frac{F}{V} = D = 0{,}1$, înseamnă că într-o oră s-a eliminat (şi alimentat) 1/10 din volumul de lucru.

Inversul vitezei de diluţiei D poartă numele de timp de staţionare a celulelor în bioreactor şi se măsoară în ore.

Se observă că, pentru a păstra constantă concentraţia biomasei, este suficient ca: $\frac{dX}{dt} = 0$ şi prin urmare:

$$\mu = D \ ,$$

aceasta fiind condiţia de atingere a regimului staţionar, adică viteza specifică de creştere a celulelor este egală cu viteza de diluţie a mediului din bioreactor.

Modificarea concentraţiei celulelor din reactor poate fi făcută în două moduri:

- modificând pe μ (chemostat);
- modificând pe D (turbidistat).

Chemostatul. Tehnica cultivării în *chemostat* (Monod, 1949) constă în reglarea concentraţiei biomasei, prin intermediul concentraţiei substratului limitativ.

Scriind ecuaţia de bilanţ de masă a substratului limitativ, pentru un interval de timp Δt, se obţine:

Substrat alimentat + Substrat existent =
= Substrat consumat + Substrat ieşit + Substrat rămas

Notând cu S_0 concentraţia substratului la alimentare, cu S concentraţia în reactor la momentul t şi cu $S + \Delta S$ concentraţia substratului la $t + \Delta t$, termenii ecuaţiei anterioare sunt:

- substrat alimentat: $F \cdot S_0 \cdot \Delta t$;
- substrat existent: $S \cdot V$;
- substrat consumat: $\Delta S \cdot V$ care se calculează astfel:

Conform ecuaţiei Monod:

$$(\Delta X)_C \cdot V = \mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V, \qquad (6.26)$$

Din relaţia de definiţie a randamentului:

$$Y_S = \frac{\Delta X}{-\Delta S} \Rightarrow \Delta X = Y_S \cdot \Delta S.$$

Înlocuind în ecuaţia (6.26) obţinem:

$$Y_S \cdot \Delta S \cdot V = \mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V \Rightarrow \Delta S \cdot V = \frac{\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V}{Y_S},$$

care reprezintă expresia pentru substratul consumat în timpul Δt;

- substrat consumat: $\frac{\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V}{Y_S}$;
- substrat ieşit: $(S + \Delta S) \cdot F \cdot \Delta t$;
- substrat rămas: $(S + \Delta S) \cdot V$.

Înlocuind în ecuaţia de bilanţ de masă, obţinem:

$$F \cdot S_0 \cdot \Delta t + S \cdot V = \frac{\mu \cdot X \cdot \Delta t \cdot V}{Y_S} + S \cdot F \cdot \Delta t + \underbrace{\Delta S \cdot F \cdot \Delta t}_{0} + S \cdot V + \Delta S \cdot V.$$

Împărţind cu $V \cdot \Delta t$ obţinem:

$$\frac{F}{V} \cdot S_0 = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} + \frac{S \cdot F}{V} + \frac{\Delta S}{\Delta t}.$$

Notăm $\frac{F}{V} = D$ şi obţinem:

$$D \cdot S_0 = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} + D \cdot S + \frac{\Delta S}{\Delta t} \text{ sau } D(S_0 - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} + \frac{\Delta S}{\Delta t}.$$

Trecând la limită, adică micşorând diferenţele finite până la valori infinitezimale, se obţine următoarea ecuaţie diferenţială:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \frac{\mu \cdot X}{Y_S};$$

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pentru regim staționar: $\frac{dS}{dt} = 0$ și atunci obținem:

$$D(S_0 - S) = \frac{\mu \cdot X}{Y_S} . \tag{6.27}$$

Pentru a păstra constantă biomasa, $\mu = D$:

$$D(S_0 - S) = \frac{X \cdot D}{Y_S} \Rightarrow X = Y_S(S_0 - S) .$$

Pe de altă parte:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow D = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \Rightarrow S; \quad S = \frac{K_S \cdot D}{\mu_m - D} .$$

Înlocuind S în expresia de definiție a randamentului de substrat:

$$X = Y_S(S_0 - S), \tag{6.28}$$

obținem în cazul regimului staționar:

$$\overline{X} = Y_S\left(S_0 - \frac{K_S \cdot D}{\mu_m - D}\right), \tag{6.29}$$

unde: $\overline{X}$ este concentrația de biomasă în condiții staționare ($\mu = D$).

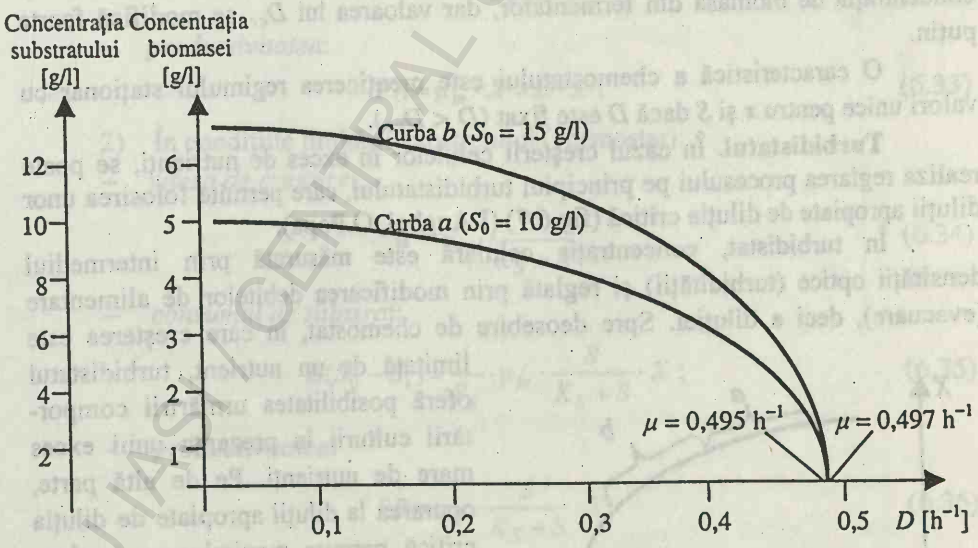


Fig.6.6. Variația teoretică a concentrației biomasei, respectiv a substratului în funcție de viteza de diluție.

Reprezentând grafic $X = f(D)$ la diverse valori ale lui S_0, se pot trage următoarele concluzii (fig.6.6) (I.Anghel, O.Popa):

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– $\mu_m = 0{,}05\ h^{-1}$ $X = 0{,}5\ g/g$

a) $S_0 = 10\ g/l$ $D_\mu = 0{,}495\ h^{-1}$;

b) $S_0 = 15\ g/l$ $D_\mu = 0{,}497\ h^{-1}$;

– la diluţii mici (timpi de staţionare mari), concentraţia de biomasă la ieşire este practic insensibilă la variaţia diluţiei (critică), denumită şi viteză de spălare;

– la diluţii mari, concentraţia de biomasă scade accentuat cu creşterea diluţiei; datorită duratelor de staţionare mici, celulele nu se pot multiplica şi doar o cantitate mică de substrat este consumată;

– există o valoare particulară a vitezei de diluţie (critică):

$$D_{cr} = \mu_{max} \frac{S_0}{K_S + S_0}, \qquad (6.30)$$

pentru care concentraţia substratului din reactor este egală cu cea din influent, ceea ce înseamnă că biomasa este eliminată din reactor.

D_{cr} se obţine din ecuaţia lui $\overline{X}$, punând condiţia:

$$\overline{X} = 0.$$

Ecuaţia (6.30) serveşte la determinarea lui μ_{max} în cultivare continuă:

– pe măsură ce concentraţia substratului limitativ se măreşte, creşte şi concentraţia de biomasă din fermentator, dar valoarea lui D_{cr} se modifică foarte puţin.

O caracteristică a chemostatului este menţinerea regimului staţionar cu valori unice pentru x şi S dacă D este fixat ($D < D_{cr}$).

Turbidistatul. În cazul creşterii celulelor în exces de nutrienţi, se poate realiza reglarea procesului pe principiul turbidistatului, care permite folosirea unor diluţii apropiate de diluţia critică (fig.6.7) (I.Anghel, O.Popa).

În turbidistat, concentraţia celulară este măsurată prin intermediul densităţii optice (turbidităţii) şi reglată prin modificarea debitelor de alimentare (evacuare), deci a diluţiei. Spre deosebire de chemostat, în care creşterea este limitată de un nutrient, turbidistatul oferă posibilitatea urmăririi comportării culturii în prezenţa unui exces mare de nutrienţi. Pe de altă parte, operarea la diluţii apropiate de diluţia critică permite maximizarea productivităţii. Acest sistem nu asigură, însă, suficientă stabilitate stării staţionare, fiind necesare modificări relativ mari ale debitelor pentru a obţine menţinerea concentraţiei.

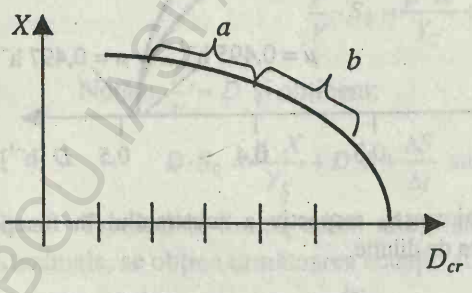


Fig. 6.7. Principiul turbidistatului:
a – domeniul chemostatului; *b* – domeniul turbidistatului.

BCU IAŞI – CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Reglarea în cazul turbidistatului se face astfel: dacă concentrația celulară este prea mare, se vor mări debitele (diluțiile) pentru a se mări cantitatea de biomasă eliminată din bioreactor. Scăderea concentrației în biomasă este însă micșorată de apariția unui fenomen secundar: la creșterea debitului de alimentare crește cantitatea de substrat limitativ introdusă în reactor și deci concentrația acestuia se va mări; aceasta duce la creșterea lui μ conform ecuației Monod. Pentru a evita acest lucru, se procedează astfel: se utilizează două alimentări în loc de una; prima soluție conține toți nutrienții cu excepția substratului limitativ. Debitul ei, mult mai mare decât al soluției ce conține doar substratul limitativ, constituie elementul prin intermediul căruia se realizează reglarea. În acest fel se poate modifica diluția, păstrând constantă concentrația lui *S*.

În concluzie, pentru cultivarea în sistem continuu sunt valabile ecuațiile prezentate în cele ce urmează.

1) În condiții nelimitate ale concentrației de nutrienți (turbidistat):

– *viteza de creștere*:

$$\mu = \mu_m; \tag{6.31}$$

– *consumul de substrat*:

$$D(S_0 - S) = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_m \cdot X; \tag{6.32}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_m \cdot X = D \cdot X. \tag{6.33}$$

2) În condițiile limitării substratului (chemostat):

– *viteza de creștere*:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S}; \tag{6.34}$$

– *consumul de substrat*:

$$D(S_0 - S_1) = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X; \tag{6.35}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_m \cdot \frac{S}{K_S + S} \cdot X. \tag{6.36}$$

3) În condițiile limitării concentrației de oxigen dizolvat:

– *viteza de creștere*:

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}}; \tag{6.37}$$

– *consumul de substrat*:

$$D(S_0 - S) = \frac{1}{Y_S} \cdot \mu_m \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot X ; \tag{6.38}$$

– *productivitatea*:

$$PR = \mu_m \cdot \frac{C_{O_2}}{K_{O_2} + C_{O_2}} \cdot X . \tag{6.39}$$

6.4.3. Bioreactorul cu recirculare externă

În unele cazuri, mediul de fermentaţie de la ieşirea din bioreactor este supus unei operaţii de separare (prin centrifugare, filtrare, sedimentare), iar concentratul conţinând biomasa se recirculă parţial în bioreactor.

Ecuaţiile ce guvernează acest proces se bazează pe aplicarea bilanţurilor de materiale pentru biomasă şi substrat.

Notăm cu *r* raportul de recirculare şi presupunem aceeaşi concentraţie a substratului şi a produsului în debitul de alimentare şi în cel de evacuare.

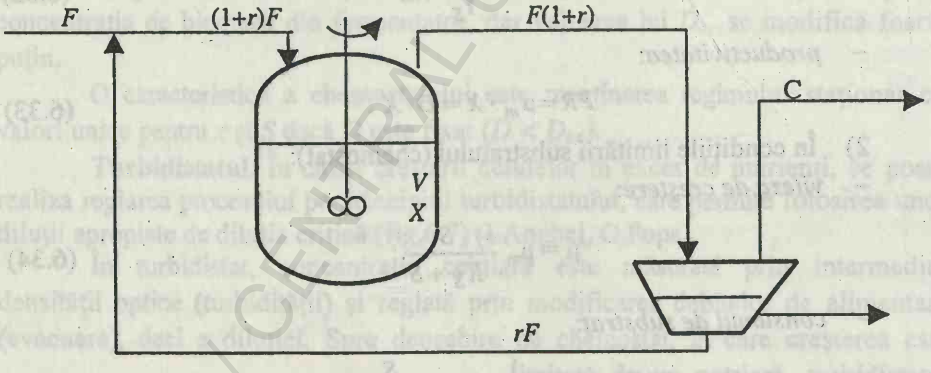


Fig.6.8. Reprezentarea schematică a bioreactorului cu recirculare.

Bilanţul de materiale pentru biomasă se scrie astfel:

Biomasă intrată + Biomasă existentă + Biomasă generată =
= Biomasă rămasă + Biomasă ieşită.

Termenii ecuaţiei de mai sus se calculează astfel:

I
- biomasă intrată: $rF \cdot \Delta t$;
- biomasă existentă: $V \cdot X$;
- biomasă generată: $\mu \cdot X \cdot V \cdot \Delta t$;

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II { – biomasă rămasă: $(x+\Delta X)V$;
– biomasă ieşită: $F(1+r)(X+\Delta X)\cdot\Delta t$.

Ecuaţia de bilanţ al biomasei:

$$rF\Delta t + VX + \mu X\cdot V\cdot\Delta t = (X+\Delta X)V + F(1+r)(X+\Delta X)\cdot\Delta t ;$$

$$rF\cdot\Delta t + XV + \mu X\cdot V\cdot\Delta t = XV + V\cdot\Delta X + F(1+r)\cdot X\cdot\Delta t + \underbrace{F(1+r)\cdot\Delta X\cdot\Delta t}_{0} ;$$

$$[rF\Delta t + \mu XV\Delta t = \Delta X\cdot V + F(1+r)\Delta t\cdot X] : (V\cdot\Delta t) ;$$

$$r\cdot\frac{F}{V} + \mu X = \frac{\Delta X}{\Delta t} + \frac{F}{V}(1+r)\cdot X .$$

La limită:

$$\lim_{\Delta t\to 0}\frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{dX}{dt} ; \qquad \frac{F}{V} = D ;$$

$$r\cdot D + \mu X = \frac{dX}{dt} + D(1+r)\cdot X .$$

În condiţii staţionare: $\dfrac{dX}{dt} = 0$

$$r\cdot D + \mu X = D(1+r)\cdot X ;$$

$$\mu = \frac{D[(1+r)X - r]}{X} = D\left[1 + r - \frac{r}{X}\right] ;$$

$$\mu = D\left[1 + r - \frac{r}{X}\right] . \qquad (6.40)$$

În cazul în care $r = 0$ (nu există recirculare), se obţine $\mu = D$, adică ecuaţia pentru regimul continuu, fără recirculare externă.

Din ecuaţia (6.40) se observă că $\mu < D$, deoarece $\mu = D\,(1+\ldots)$. Aceasta înseamnă că diluţia este mai mare decât viteza de creştere μ şi, deci, în cazul recirculării celulelor în bioreactor se poate lucra la diluţii mai mari.

Bilanţul substratului:

I { – substrat intrat: $(FS_0 + rFS)\Delta t$;
– substrat existent: $S\cdot V$.

Substratul consumat se calculează astfel:

$$\frac{\Delta X}{\Delta t} = \mu\cdot X ; \qquad \Delta X = \mu X\Delta t ;$$

$$Y_S = \frac{\Delta X}{\Delta S} \Rightarrow \Delta X = Y_S\cdot\Delta S ;$$

$$\Delta S\cdot Y_S = \mu X\Delta t \Rightarrow \Delta S = \frac{1}{Y_S}\cdot\mu\cdot X\cdot\Delta t ;$$

BCU "I. C. BRĂTIANU" UNIVERSITY LIBRARY

II
- substrat consumat: $\frac{1}{Y_S}\cdot\mu\cdot X\cdot\Delta t\cdot V$;
- substrat rămas: $(S+\Delta S)V$;
- substrat ieşit: $F(1+r)\cdot(S+\Delta S)\cdot\Delta t$.

Ecuaţia de bilanţ pentru substrat se obţine astfel:

$$(FS_0+rFS)\Delta t+SV=\mu\cdot\frac{1}{Y_S}\cdot X\cdot\Delta t\cdot V+(S+\Delta S)V+F(1+r)(S+\Delta S)\cdot\Delta t;$$

$$FS_0\cdot\Delta t+rFS\cdot\Delta t+SV=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X\cdot\Delta t\cdot V+SV+\Delta S\cdot V+F(1+r)S\cdot\Delta t+\underbrace{F(1+r)\Delta S\cdot\Delta t}_{0};$$

$$[FS_0\cdot\Delta t+rFS\Delta t=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X\cdot\Delta t\cdot V+V\cdot\Delta S+F(1+r)S\cdot\Delta t]:V\Delta t;$$

$$\cdot\frac{F}{V}S_0+r\frac{F}{V}S=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X+\frac{\Delta S}{\Delta t}+\frac{F}{V}(1+r)S;$$

$$\frac{F}{V}S_0+r\frac{F}{V}S=\frac{\mu}{Y_S}\cdot X+\frac{dS}{dt}+\frac{F}{V}\cdot S+\frac{F}{V}\cdot r\cdot S;$$

$$\frac{dS}{dt}=\frac{F}{V}(S_0-S)-\mu\frac{X}{Y_S};$$

$$\frac{F}{V}=D;\qquad\frac{dS}{dt}=0;$$

$$\frac{\mu X}{Y_S}=D(S_0-S). \tag{6.41}$$

Relaţia (6.41) este aceeaşi ca în cazul chemostatului.

6.4.4. Bioreactorul ideal cu deplasare (*D*) (curgere tip piston)

Reactoarele cu amestecare, operate discontinuu sau continuu sunt tipurile de bioreactoare cel mai frecvent întâlnite în biotehnologie.

Există însă situaţii în care se utilizează şi reactoarele tubulare (cu diametrul mult mai mic decât lungimea), acestea având următoarele avantaje:

– construcţie simplă, fără zone stagnante; în acest caz ridicarea la scară industrială se realizează mai uşor, fără riscuri;

– se poate regla durata de staţionare a celulelor în bioreactor, astfel încât conversia substratului să fie mai mare şi concentraţia produsului finit mai mare;

– spumarea este mai mică;

– eforturile de forfecare sunt mai mici, deci distrugerea pereţilor celulelor este mai mică.

ECUA CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Reactorul cu o curgere tip pistoneste caracterizat prin existența unui profil plan de viteze în secțiune perpendiculară pe direcția de deplasare a fluidului (axa reactorului). Aceasta este o idealizare, deoarece implică o amestecare radială infinită și lipsa amestecării axiale.

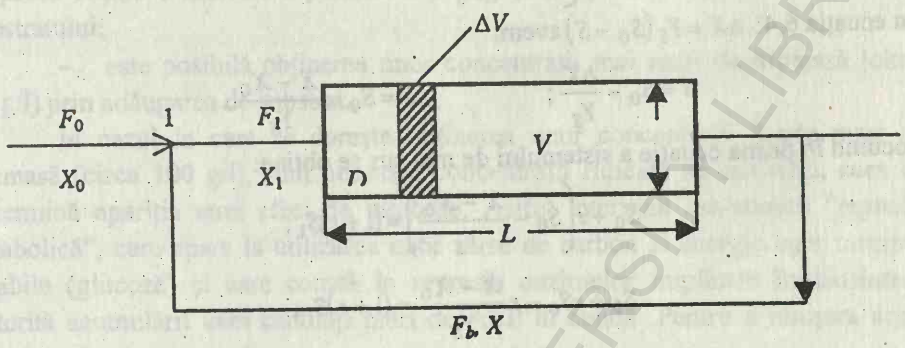


Fig.6.9. Reprezentarea schematică a reactorului cu deplasare.

Ecuațiile caracteristice pentru acest tip de reactor se obțin din ecuațiile de bilanț de masă, scrise la nivelul unui element de reactor.

Notând cu F_0 debitul volumetric de mediu introdus în bioreactor și cu F_b debitul biomasei alimentate a cărei concentrație este X_b, se poate face un bilanț al masei celulare în punctul *1*:

$$\begin{cases} F_0 + F_b = F_1; \\ F_0 X_0 + F_b X = F_1 X_1 \end{cases}$$

Împărțind ambele ecuații cu F_0 și ținând seama că parametrul modelului este raportul de recirculare, $r = \frac{F_b}{F_0}$, se obține :

$$1 + r = \frac{F_1}{F_0};$$

$$X_0 + rX = \frac{F_1}{F_0} X_1;$$

$$X_0 + rX = (1 + r) X_1;$$

$$X_1 = \frac{X_0 + rX}{1 + r}.$$

Dacă scriem bilanțul pentru substrat:

$$\begin{cases} F_0 S_0 + F_b \cdot S = F_1 S_1 \\ F_0 + F_b = F_1 \end{cases}$$

Împărțim cu F_0 și notând $\frac{F_b}{F_0} = r$ – raportul de recirculare, obținem:

$$\begin{cases} S_0 + rS = (1+r)S_1 \\ 1 + r = \frac{F_1}{F_0} \end{cases}.$$

Din ecuația 6.4: $\Delta X = Y_S(S_0 - S)$ avem:

$$S = S_0 - \frac{\Delta X}{Y_S}; \qquad S = S_0 - \frac{X - X_0}{Y_S}.$$

Înlocuind în prima ecuație a sistemului de mai sus se obține:

$$S_0 + r\left(S_0 - \frac{X - X_0}{Y_S}\right) = (1+r)S_1;$$

$$S_0 + rS_0 - r\frac{X - X_0}{Y_S} = (1+r)S_1;$$

$$(1+r)S_0 - r\frac{X - X_0}{Y_S} = (1+r)S_1;$$

$$S_1 = S_0 - \frac{r}{1+r} \cdot \frac{X - X_0}{Y_S}. \qquad (6.42)$$

Concentrația în biomasă în reactorul ideal cu deplasare tip piston variază în funcție de diluție. De asemenea, concentrația inițială a microorganismelor influențează concentrația biomasei din bioreactor: cu cât X_0 este mai mic, timpul de staționare în reactor, necesar atingerii unei anumite concentrații, va crește.

6.4.5. Operarea bioreactoarelor în culturi extinse (cu adaosuri)

În afara modalităților de operare a bioreactoarelor, expuse anterior, în practica biotehnologică se folosește cu succes și tehnica adăugării în bioreactor a unuia sau a mai multor substraturi, în timpul cultivării, fără eliminare de biomasă (fermentație cu adaosuri), numită și cultură extinsă sau operare în sistem semicontinuu.

Acest tip de cultivare se situează între cultivarea "în șarjă" și cea continuă.

Caracteristicile celor trei tipuri de operare:

- *în șarjă*: concentrația substratului scade;
- *continuu*: concentrația substratului este constantă;
- *semicontinuu*: concentrația substratului se menține constantă o perioadă, după care scade.

Avantajele sistemului de operare semicontinuu sunt următoarele:

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– prin alimentarea mediului în timpul cultivării se obţin rezultate superioare în productivitate faţă de sistemul discontinuu;

– în cazul în care se utilizează nutrienţi cu proprietăţi inhibitoare (metanol, etanol, acid acetic), prin menţinerea concentraţiei acestora între anumite limite se poate obţine o scurtare a perioadei de *lag* şi micşorarea efectului inhibitor al substratului;

– este posibilă obţinerea unor concentraţii mai mari de biomasă (circa 50 g/l) prin adăugarea de substrat.

În cazul în care se doreşte obţinerea unor concentraţii foarte mari de biomasă (circa 100 g/l), sunt necesare concentraţii ridicate de nutrienţi, ceea ce determină apariţia unui efect de inhibiţie. Astfel intervine aşa-numita "represie catabolică", care apare la utilizarea unor surse de carbon şi energie uşor metabolizabile (glucoză) şi care constă în represia enzimelor implicate în biosinteză datorită acumulării unei cantităţi mari de ATP în celulă. Pentru a micşora acest efect se adaugă treptat glucoza.

Ecuaţiile de bază în cazul culturilor semicontinue se obţin pornind de la bilanţul de masă.

Datorită alimentării fără evacuare, pe parcursul biosintezei are loc o mărire a volumului cu ΔV în timpul Δt.

Dacă facem următoarele notaţii: F – debitul de alimentare al substratului, F_b – debitul de alimentare cu o bază oarecare necesară corectării *p*H-ului; F_{as} – debitul de antispumant; F_{ev} – debitul apei evaporate (pentru culturi aerobe), atunci variaţia de volum va fi dată de relaţia:

$$\Delta V = F \cdot \Delta t + F_b \cdot \Delta t + F_{as} \cdot \Delta t - F_{ev} \cdot \Delta t .$$

Faţă de volumul total, volumul de bază şi volumul de antispumant sunt mici; de exemplu, volumul bazei < 0,1% pentru că se adaugă baze concentrate NH_3 25% sau NaOH 40%. Volumul de antispumant (ulei de floarea soarelui, ulei siliconic) este de circa 0,1%.

S-a constatat că la un debit de aer de 1 l aer/l mediu /min, la temperatură cuprinsă între 30...40°C, pierderile prin evaporare în decurs de 2 zile sunt de cca 4%.

În concluzie, faţă de volumul total se poate neglija termenul $(F_b + F_{as} - F_v)$ şi, în acest caz, variaţia volumului este dată de ecuaţia simplificată:

$$\Delta V = F \cdot \Delta t \text{ sau } F = \frac{\Delta V}{\Delta t} \text{ sau } F = \frac{dV}{dt} . \qquad (6.43)$$

Ecuaţia de bilanţ a biomasei se calculează cu relaţia:

Biomasă existentă + Biomasă generată = Biomasă rezultată

adică:

$$VX + \mu XV\Delta t = (V + \Delta V)(X + \Delta X) .$$

Efectuând operațiile obținem:

$$[VX + \mu XV\Delta t = VX + \underbrace{V\Delta X + X\Delta V}_{\Delta(VX)} + \underbrace{\Delta V \cdot \Delta X}_{0}] : \Delta t ;$$

$$\mu VX = \frac{\Delta(VX)}{\Delta t} . \qquad (6.44)$$

La limită, atunci când diferențele finite tind către diferențe infinitezimale, se obține următoarea ecuație diferențială:

$$\frac{d(VX)}{dt} = \mu VX . \qquad (6.45)$$

Se scrie bilanțul de materiale pentru substrat:

Substrat intrat + Substrat existent = Substrat generat + Substrat rămas

adică:

$$FS_0\Delta t + VS = \frac{\mu XV}{Y_S} \cdot \Delta t + (S + \Delta S)(V + \Delta V) .$$

Procedând ca în cazul precedent, se obține succesiv:

$$[FS_0\Delta t + VS = \frac{\mu XV}{Y_S} \cdot \Delta t + SV + \underbrace{S\Delta V + V\Delta S}_{\Delta(VX)} + \underbrace{\Delta S \cdot \Delta V}_{0}] : \Delta t ;$$

$$FS_0 = \frac{\mu XV}{Y_S} + \frac{\Delta(VS)}{\Delta t} ;$$

$$\lim \frac{\Delta(VS)}{\Delta t} = \frac{d(VS)}{dt} ;$$

$$\frac{d(VS)}{dt} = FS_0 - \frac{1}{Y_S} \cdot \frac{d(VX)}{dt} . \qquad (6.46)$$

Din ecuațiile (6.43) și (6.45):

$$\begin{cases} F = \dfrac{dV}{dt} \\ \dfrac{d(VX)}{dt} = \mu VX \end{cases}$$

Prin împărțire la V, se obține, succesiv:

$$\begin{cases} \dfrac{F}{V} = \dfrac{dV}{Vdt} \\ \dfrac{d(VX)}{V \cdot Xdt} = \mu^* \end{cases}$$

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Făcând notațiile: $\frac{F}{V} = D$ și $\frac{d(VX)}{VXdt} = \mu^*$ se obține:

$$\frac{XdV + VdX}{VXdt} = \mu^* \Rightarrow X\frac{dV}{Vdt} + \frac{dX}{dt} = X\mu^*;$$

$$XD + \frac{dX}{dt} = X\mu^* \Rightarrow \frac{dX}{dt} = X(\mu^* - D), \qquad (6.47)$$

unde μ^* reprezintă viteza specifică de creștere (h^{-1}) corectată pentru variația volumului.

Se observă că dacă $V = ct \Rightarrow \mu^* = \mu$.

Ecuația obținută este identică cu cea obținută pentru cultivarea continuă, dar deoarece V crește, D nu mai este constantă.

6.5. CONFIGURAȚIA BIOREACTOARELOR. TIPURI CONSTRUCTIVE

Bioreactorul este "inima" oricărei fermentații sau bioconversii enzimatice. Configurația și construcția unui bioreactor se realizează pe baza unor principii de inginerie bine fundamentate științific. Alegerea tipului de bioreactor este în strânsă legătură cu tipul bioprocesului ce urmează a se desfășura în el. Acest lucru presupune luarea unor decizii importante referitoare la următoarele aspecte:

– configurația bioreactorului: cu agitare mecanică sau un vas cu aerare fără agitare?

– mărimea bioreactorului: ce dimensiune a bioreactorului este necesară pentru a asigura producția rentabilă a produsului?

– condițiile bioprocesului din interiorul bioreactorului: *p*H, temperatură, concentrația oxigenului dizolvat;

– sistemul de operare respectiv și dacă bioreactorul va funcționa în sistem discontinuu sau în sistem continuu? Va fi bioreactorul cuplat în serie cu alte bioreactoare sau va fi singur?

Decizia luată în legătură cu problemele enunțate anterior va avea un impact deosebit asupra performanței ulterioare a bioprocesului.

Bioreactoarele cilindrice cu sau fără agitare sunt cel mai des utilizate în biotehnologie.

Tipuri noi de bioreactoare au fost construite pentru aplicații speciale, cum ar fi: culturi de țesuturi vegetale sau animale și bioreactoare pentru celule imobilizate.

După natura proceselor biotehnologice, reactoarele pot fi clasificate în:

– reactoare biologice: în care se desfăşoară un proces de fermentaţie (cu biomasă);

– reactoare biochimice: în care se desfăşoară procesele enzimatice.

Reactoarele biologice pot fi pentru fermentaţii aerobe sau anaerobe.

Reactoarele biochimice pot fi: cu enzime libere, cu enzime imobilizate şi cu fază solidă.

Formele constructive şi modurile de operare ale bioreactoarelor pot fi foarte diferite, în funcţie de cerinţele şi specificaţiile proceselor tehnologice.

Reactoare pentru fermentaţii aerobe. După modul de introducere a energiei necesare amestecării fazei lichide (substrat + microorganisme) şi dispersării fazei gazoase (aer), reactoarele aerobe se pot diviza în trei categorii:

– cu amestecare mecanică;

– cu pompă de recirculare;

– cu aer comprimat.

În figurile 6.10 – 6.14 sunt prezentate cele trei categorii de bioreactoare.

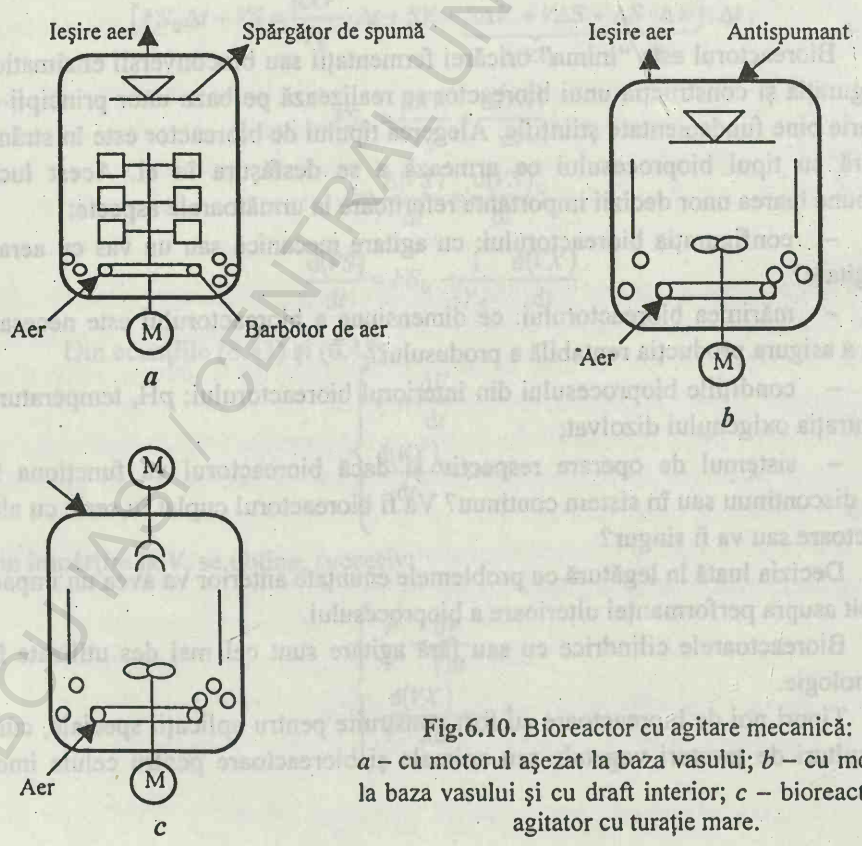


Fig.6.10. Bioreactor cu agitare mecanică:
a – cu motorul aşezat la baza vasului; *b* – cu motorul la baza vasului şi cu draft interior; *c* – bioreactor cu agitator cu turaţie mare.

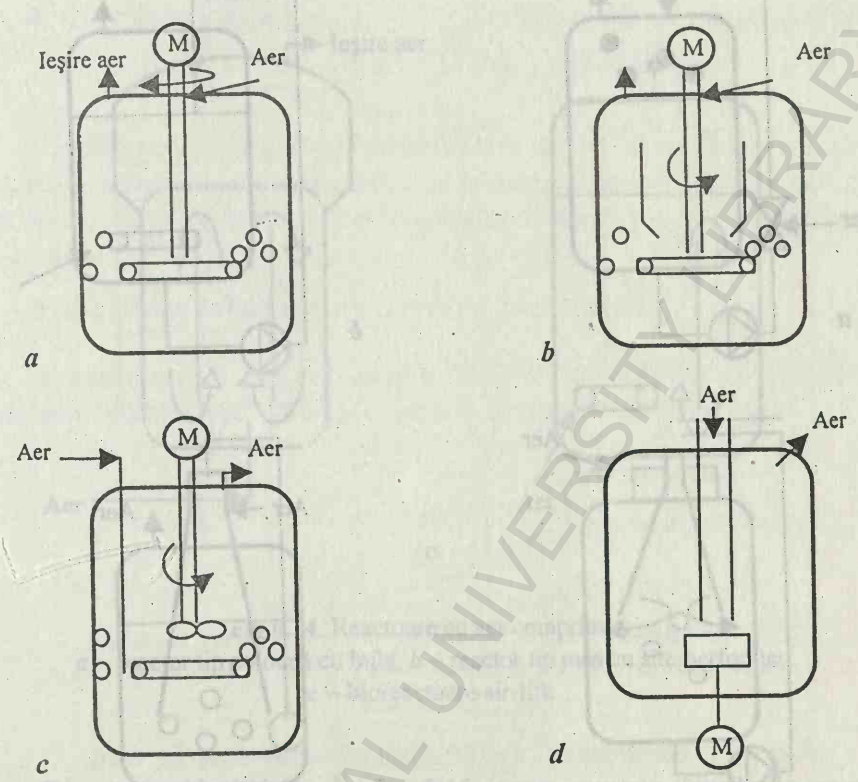


Fig.6.11. Bioreactoare cu agitare mecanică cu barbotare de aer (prin axul agitatorului sau separat):
a, *b* – cu barbotare prin axul agitatorului; *c* – cu barbotor separat cu agitare sus; *d* – cu tub de aspirație a aerului.

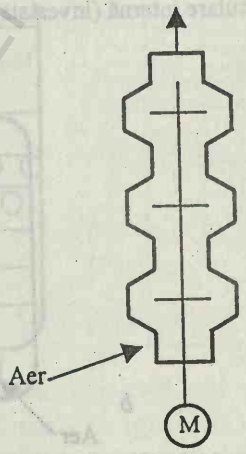


Fig.6.12. Reactor cu agitare in mai multe stadii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

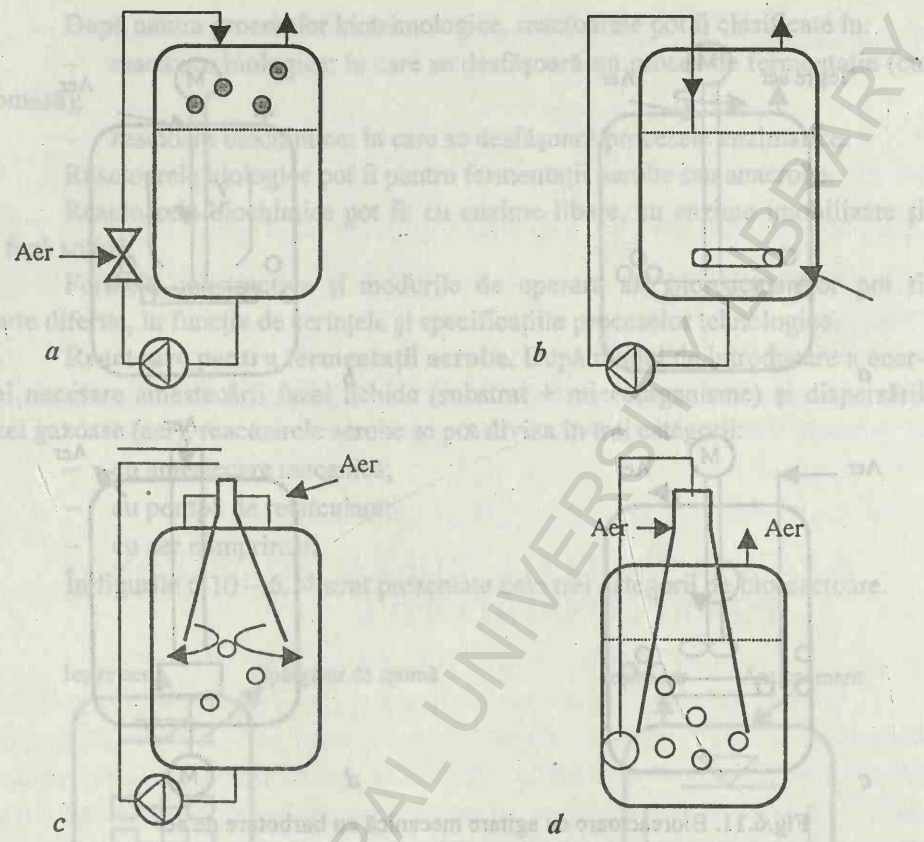


Fig.6.13. Reactoare cu pompă de recirculare a fazei lichide:
a – cu recirculare externă; *b* – cu buclă de recirculare; *c* – cu recirculare cu jet;
d – cu recirculare internă (inversată)

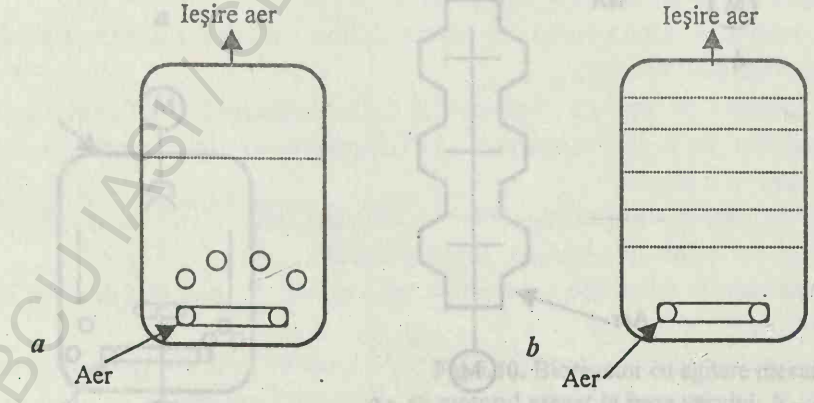


Fig. 6.14.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

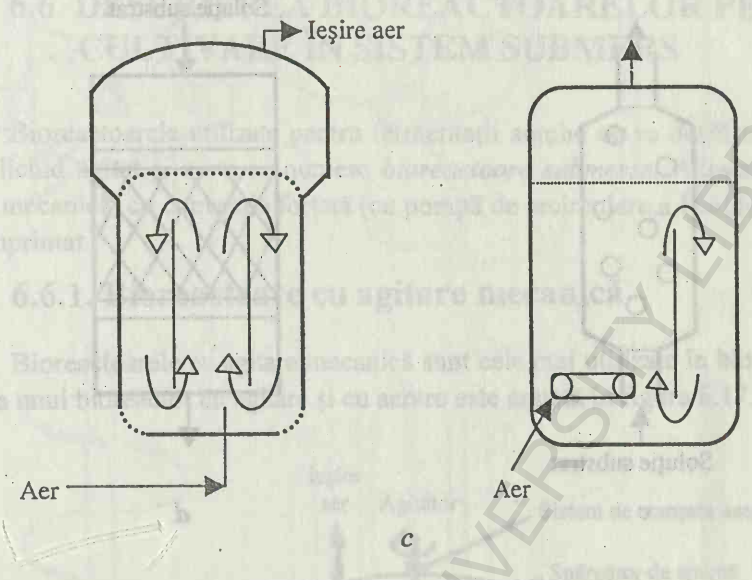


Fig.6.14. Reactoare cu aer comprimat:
a – reactor tip coloană cu bule; *b* – reactor tip turn cu site perforate;
c – bioreactoare air-lift.

Reactoare biochimice. În fig. 6.15 sunt prezentate tipurile de reactoare biochimice.

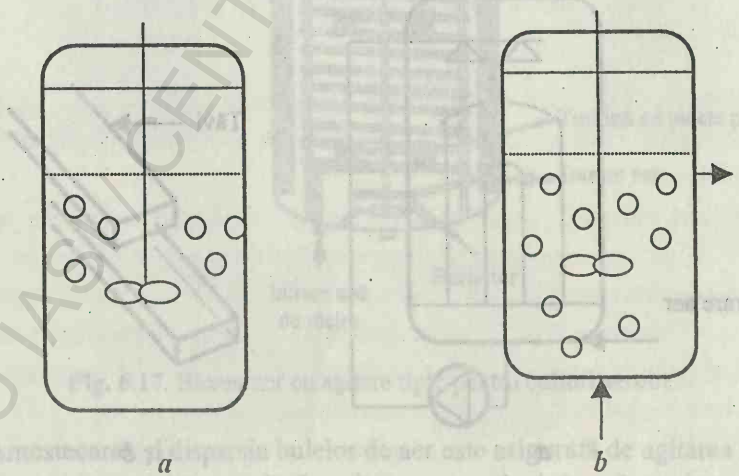


Fig.6.15

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

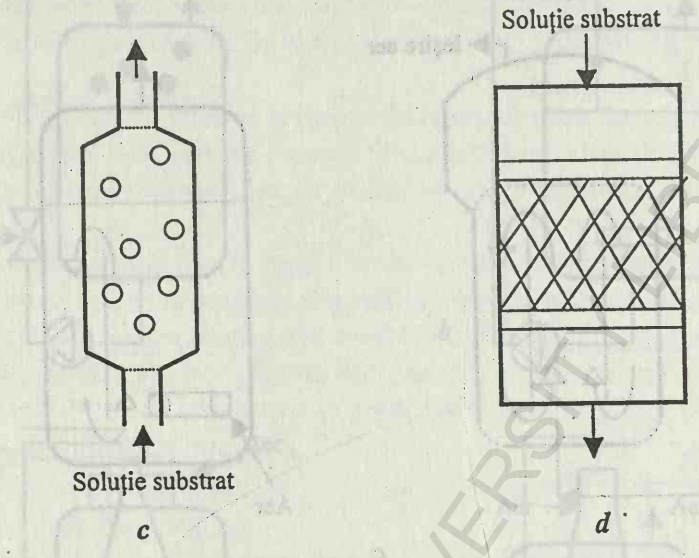


Fig.6.15. Reactoare biochimice:
a – cu enzime libere, discontinuu; *b* – cu enzime libere, continuu;
c – în pat fluidizat (cu enzime libere); *d* – cu enzime imobilizare pe suport.

Alte tipuri constructive de reactoare sunt prezentate în fig. 6.16.

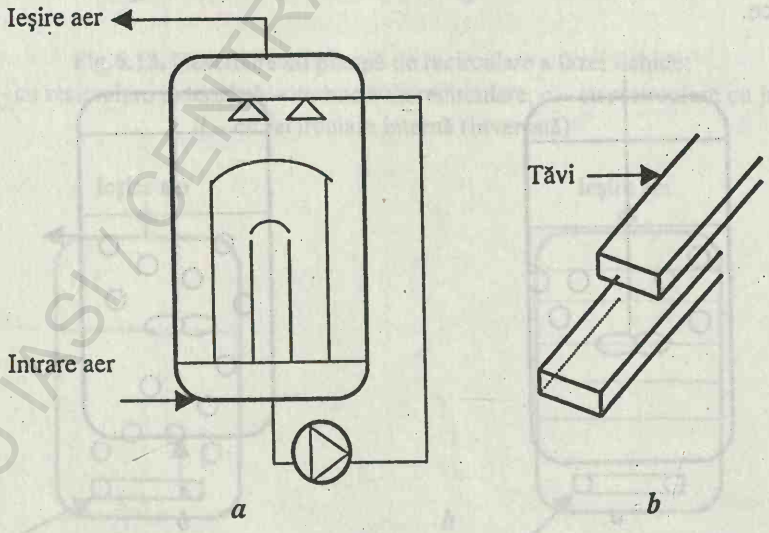


Fig.6.16. Alte tipuri constructive de bioreactoare:
a – cu film de lichid; *b* – pentru culturi de suprafață.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.6. DESCRIEREA BIOREACTOARELOR PENTRU CULTIVARE ÎN SISTEM SUBMERS

Bioreactoarele utilizate pentru fermentații aerobe ce se desfășoară într-un mediu lichid agitat și aerat se numesc *bioreactoare submerse*. Acestea pot fi cu agitare mecanică, cu convecție forțată (cu pompă de recirculare a lichidului) sau cu aer comprimat.

6.6.1. Bioreactoare cu agitare mecanică

Bioreactoarele cu agitare mecanică sunt cele mai utilizate în biotehnologie. Schema unui bioreactor cu agitare și cu aerare este arătată în figura 6.17.

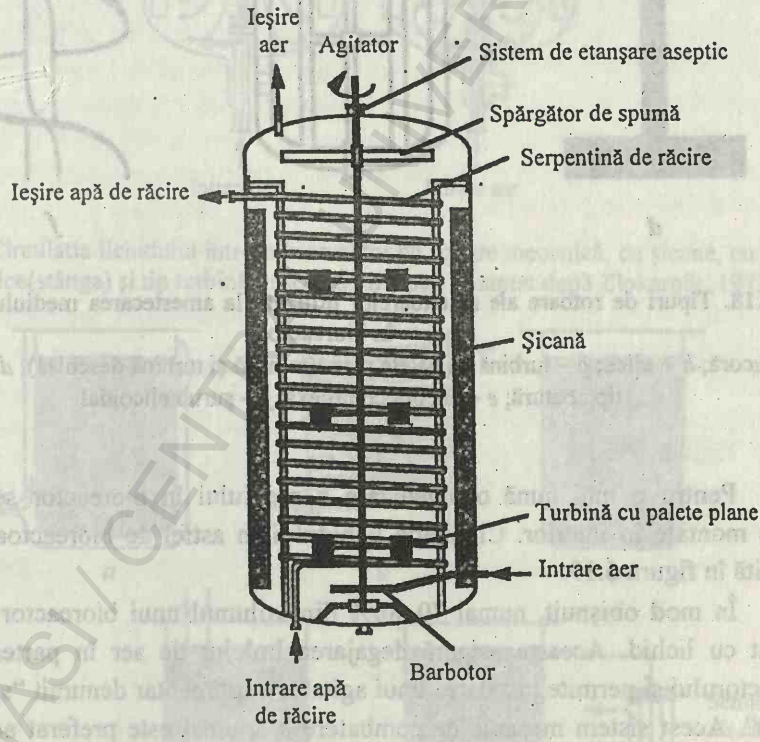


Fig. 6.17. Bioreactor cu agitare tipic pentru culturi aerobe.

Amestecarea și dispersia bulelor de aer este asigurată de agitarea mecanică; aceasta impune o anumită energie de agitare pe un nivel de volum și un anumit tip de agitator. Diferitele tipuri de agitatoare diferă între ele prin tipul și caracteristicile rotorului (fig.6.18).

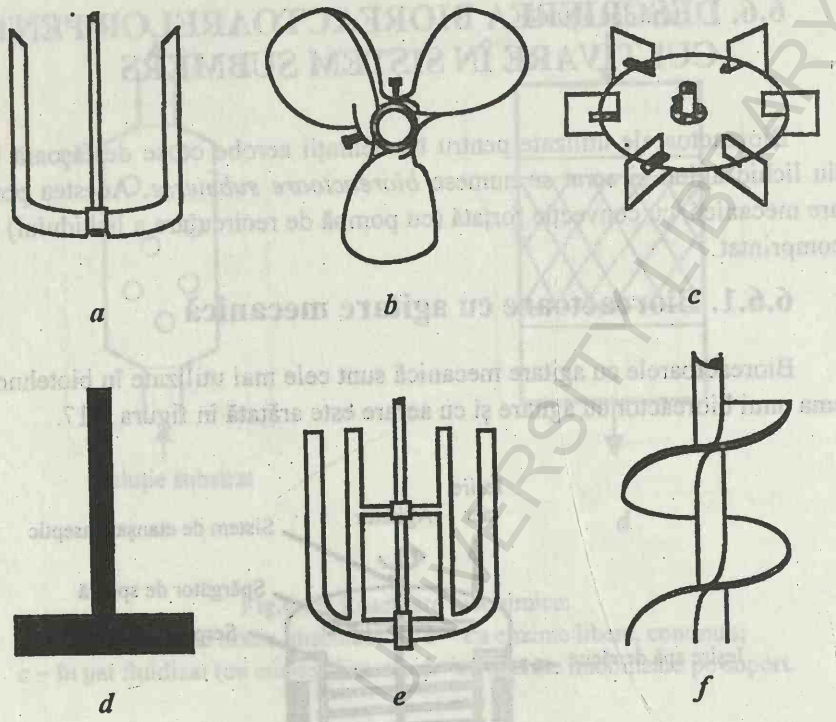


Fig. 6.18. Tipuri de rotoare ale agitatoarelor utilizate la amestecarea mediului de cultură în bioreactor:
***a* – ancoră; *b* – elice; *c* – turbină cu palete plane(numită şi turbină deschisă); *d* – cu palete tip zbatură; *e* – ancoră complexă; *f* – şurub elicoidal.**

Pentru o mai bună omogenizare a mediului în bioreactor se utilizează şicane montate în interior. Circulaţia lichidului în astfel de bioreactoare poate fi urmărită în figura 6.19.

În mod obişnuit, numai 70–80% din volumul unui bioreactor agitat este umplut cu lichid. Aceasta asigură degajarea bulelor de aer în partea de sus a bioreactorului şi permite instalarea unui agitator suplimentar denumit "spărgător de spumă". Acest sistem mecanic de combatere a spumei este preferat adăugării de antispumanţi chimici care micşorează coeficientul de transfer al oxigenului. Viteza de agitare variază în funcţie de natura bioprodusului.

Bioreactorul cu agitare este prevăzut cu un sistem de răcire, care poate fi o serpentină internă. Există însă mai multe moduri de a prelua căldura de reacţie degajată în timpul fermentaţiei în bioreactor (fig. 6.20).

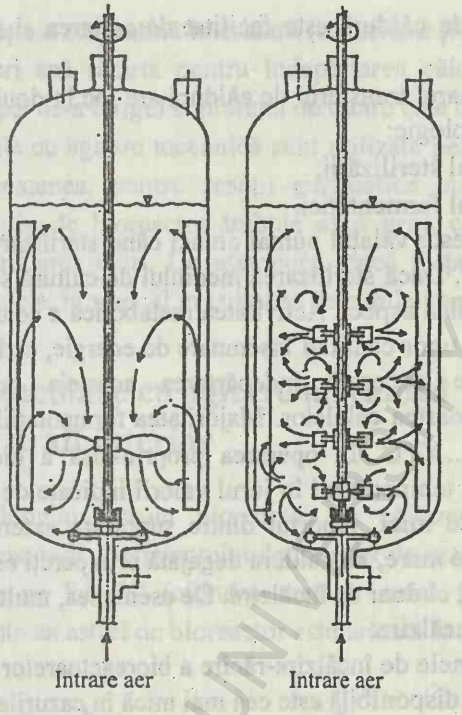


Fig. 6.19. Circulatia lichidului într-un bioreactor cu agitare mecanică, cu şicane, cu agitator tip elice(stânga) şi tip turbină deschisă (dreapta) (adaptat după Zlokarnik, 1972).

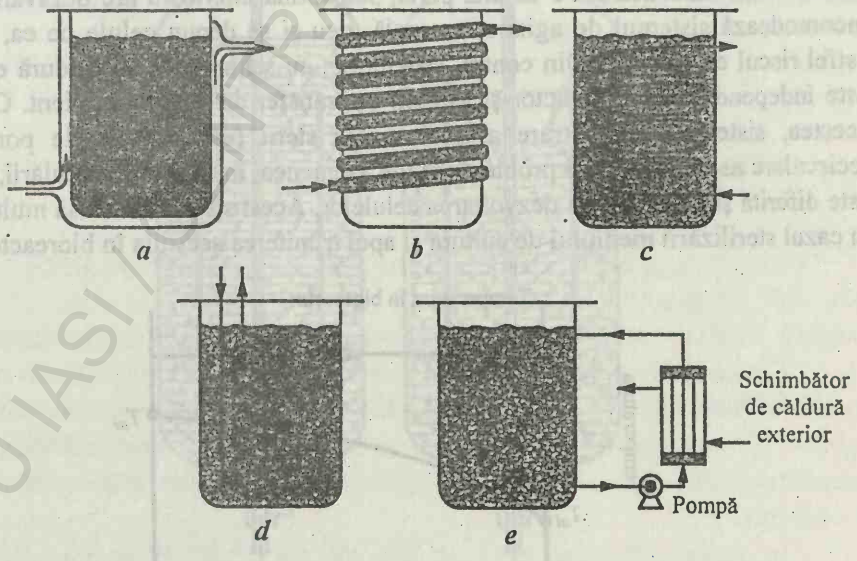


Fig. 6.20. Sisteme de încălzire-răcire a bioreactorului:
a – cu manta de încălzire-răcire; *b* – cu serpentină exterioară; *c* – cu serpentină interioară; *d* – cu serpentină interioară tip "şicană"; *e* – cu schimbător de căldură exterior.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Transferul de căldură este facilitat de agitarea şi turbulenţa mediului de căldură.

În bioreactoare, transferul de căldură are loc în două ipostaze pe parcursul unui proces biotehnologic:

- în timpul sterilizării;
- în timpul fermentaţiei.

Primul caz este valabil numai atunci când sterilizarea mediului de cultură are loc în bioreactor. Dacă sterilizarea mediului de cultură se efectuează în alt vas, rămâne numai al doilea aspect. Activitatea metabolică a celulelor se desfăşoară, de obicei, cu degajarea unor cantităţi însemnate de energie, astfel încât, la majoritatea bioreactoarelor este necesară îndepărtarea acesteia pentru a nu produce supraîncălzirea şi moartea celulelor. Majoritatea fermentaţiilor au loc în intervalul de temperatură 30...37°C. În operarea propriu-zisă a bioreactoarelor se pune problema menţinerii temperaturii în jurul valorii indicate de tehnologia respectivă. Pentru bioreactoarele mici, raportul dintre suprafaţa externă a bioreactorului şi volumul acestuia este mare, iar căldura degajată prin pereţi este mare astfel încât nu este nevoie de răcire, ci doar de încălzire. De asemenea, multe reacţii enzimatice au nevoie de o uşoară încălzire.

Dintre sistemele de încălzire-răcire a bioreactoarelor expuse în figura 6.20, suprafaţa de transfer disponibilă este cea mai mică în cazurile *a* şi *b* faţă de cazul *c*.

Mantaua de răcire-încălzire asigură un bun transfer în cazul bioreactoarelor de laborator şi al altor bioreactoare de dimensiuni mai mici, dar sunt inadecvate pentru scară industrială. Pe de altă parte, serpentina interioară are dezavantajul că incomodează sistemul de agitare, se spală greu şi se depun celule pe ea, mărind astfel riscul de infecţie. Din contră, sistemul *e*, cu schimbător de căldură exterior, este independent de bioreactor şi asigură un transfer de căldură eficient. Cu toate acestea, sistemul de păstrare a unui mediu steril (este nevoie de pompe de recirculare aseptice) ridică probleme şi, de asemenea, în timpul recirculării, aeraţia este diferită şi poate afecta dezvoltarea celulelor. Acest sistem este însă mult folosit în cazul sterilizării mediului de cultură şi apoi trimiterea acestuia în bioreactor.

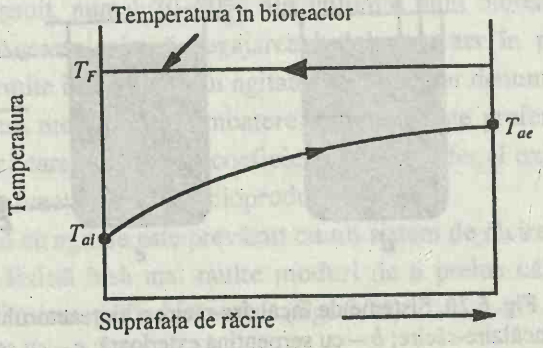


Fig.6.21. Variaţia temperaturii apei de răcire în timpul fermentaţiei.

Când se foloseşte o serpentină interioară (cazurile *c* şi *d*), prin care trece un agent de răcire deseori apă răcirtă pentru îndepărtarea căldurii de fermentaţie, variaţia temperaturii apei de-a lungul suprafeţei de răcire este dată în figura 6.21.

Fermentatoarele cu agitare mecanică sunt utilizate pentru celule libere sau imobilizate şi, de asemenea, pentru reacţii enzimatice cu enzime libere sau imobilizate. La acest tip de bioreactor trebuie avut grijă ca celulele să nu fie distruse datorită agitării prea mari. De asemenea, dacă forţa de forfecare e prea mare, poate afecta celulele, în special în culturile de celule vegetale .

6.6.2. Bioreactoare cu agitare mecanică şi cu draft interior

Circulatia lichidului într-un bioreactor cu agitare mecanică poate fi modificată (în sensul creşterii coeficientului de transfer de masă), dacă în interiorul acestuia se introduce un "draft" (cilindru metalic axial fără fund şi capac). Circulaţia lichidului într-un astfel de bioreactor este arătată în figura 6.22.

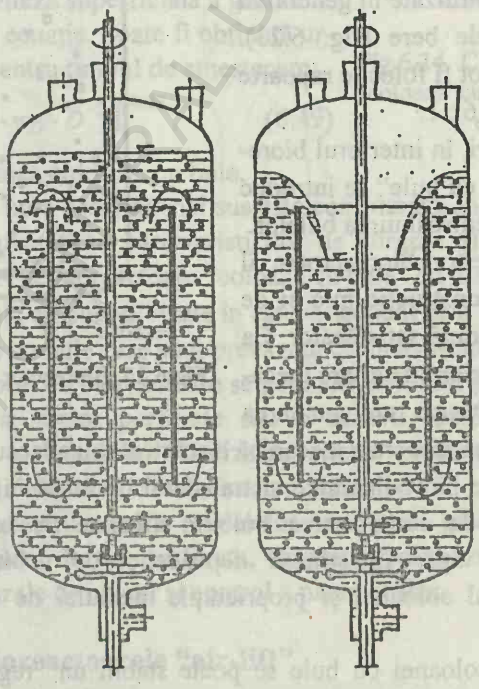


Fig. 6.22. Circulaţia lichidului în bioreactor cu draft complet imersat în lichidul de cultură (stânga) şi cu revărsare (dreapta) (adaptat după Keitel, 1978).

6.6.3. Bioreactoare cu aer comprimat

6.6.3.1. Bioreactoare tip "coloană cu bule"

O alternativă la bioreactoarele cu agitare mecanică o constituie bioreactoarele fără sistem de agitare mecanică. În aceste bioreactoare, agitarea mediului de cultură se realizează exclusiv prin barbotare de aer. Energia consumată este mai mică decât în cazul agitării mecanice. Aceste bioreactoare tip "coloană cu bule" se utilizează în industria drojdiei de bere, în industria berii, a vinului şi în tratarea apelor reziduale.

Din punct de vedere structural, bioreactoarele tip "coloană cu bule" sunt foarte simple, ele fiind, în general, vase cilindrice. În afară de barbotor, adică de sistemul de distribuţie a aerului în masa lichidă, pentru intrarea aerului comprimat, aceste bioreactoare nu mai au în general nimic în interior. Raportul înălţime : diametru, de aproximativ 3 : 1, este aplicat pentru bioreactoarele utilizate în general în producerea drojdiei de bere (fig. 6.23). Pentru alte aplicaţii, pot fi folosite rapoarte mai mari, de exemplu 6 : 1.

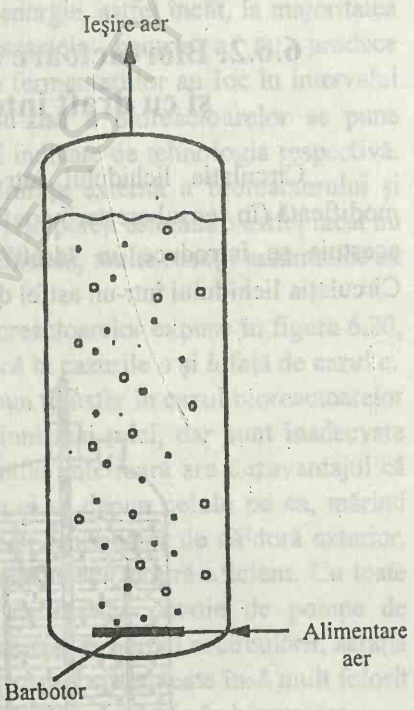


Fig.6.23. Bioreactor tip coloană cu bule.

În unele cazuri, în interiorul bioreactorului tip "coloană cu bule" se introduc site perforate pentru redistribuirea bulelor.

Avantajul acestor bioreactoare îl constituie costul de construcţie mic şi de transfer de masă şi căldură satisfăcător. Ca şi în cazul bioreactoarelor cu agitare mecanică, pot apărea probleme cu spumarea mediului, fiind necesară dispersia mecanică a acesteia sau adaosul de antispumanţi.

Caracteristicile hidrodinamice şi transferul de masă în coloanele cu bule depind în întregime de comportarea bulelor eliberate de barbotor. Diferitele regimuri de curgere apar în strânsă dependenţă de debitul de gaz, tipul barbotorului, diametrul coloanei şi proprietăţile mediului de cultură, cum ar fi vâscozitatea.

În interiorul coloanei cu bule se poate stabili un "regim omogen" dacă debitul de aer este mic şi distribuit uniform în coloană. În acest caz, bulele de gaz urcă cu aceeaşi viteză şi nu se amestecă între ele, iar agitarea lichidului este limitată.

În condiţii normale de operare, dar la viteze mult mai mari ale gazului, în interiorul coloanei se creează o circulaţie haotică a celulelor, stabilindu-se un "regim eterogen" (ca în fig. 6.24).

În acest regim, bulele şi lichidul tind să se ridice prin centrul coloanei, în timp ce curentul de lichid care coboară se instalează pe lângă pereţii bioreactorului. Circulaţia lichidului antrenează bulele şi astfel se produce o amestecare a aerului.

Timpul de amestecare în coloanele cu bule depinde de regimul de curgere. Pentru "regimul eterogen" s-a propus următoarea ecuaţie(Doran P.,1998):

$$w_L = 0{,}9(g \cdot D \cdot w_G)^{0{,}33}, \qquad (6.48)$$

unde: w_L este viteza liniară de deplasare a lichidului; g – acceleraţia gravitaţională; D – diametrul coloanei; w_G – viteza superficială a gazului.

Din această ecuaţie, poate fi obţinută următoarea expresie pentru timpul de amestecare:

$$t_m = 11\frac{H}{D}\left(g \cdot w_G \cdot D^{-2}\right)^{-0{,}33}, \qquad (6.49)$$

în care H este înălţimea coloanei cu bule.

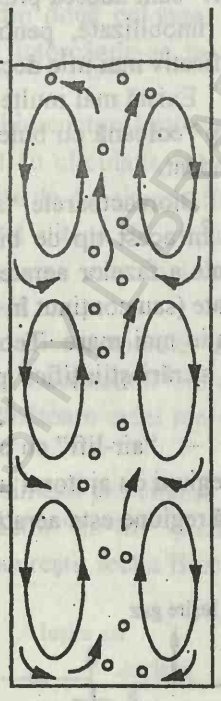


Fig.6.24. Circulaţia fluidului într-o "coloană cu bule" aflată în "regim eterogen".

Coloana cu bule descrisă mai sus este considerată, în general, cu un singur stadiu. Pentru îmbunătăţirea caracteristicilor de curgere şi amestecare, se construiesc adesea tipuri de bioreactoare "coloană cu bule" cu mai multe stadii:

- coloanele cu bule divizate în câteva secţiuni prin site perforate;
- coloane cu bule care sunt prevăzute cu amestecătoare locale.

În aceste tipuri de bioreactoare se pot cultiva *E. coli* şi drojdii.

Introducerea sitelor perforate sau a agitării locale reduce intensitatea amestecării axiale a lichidului. Utilizarea sitelor perforate duce la creşterea considerabilă a coeficientului de transfer de masă.

Datorită varietăţii mari a modelelor (diametrul găurilor, secţiunea transversală liberă, numărul de site perforate, varietatea compoziţiei mediilor) nu s-au elaborat relaţii generale de calcul şi control a parametrilor.

6.6.3.2. Bioreactoarele "air-lift"

Unul dintre cele mai utilizate tipuri de bioreactoare în biotehnologie este bioreactorului "air-lift". Ca şi cele de tip "coloană cu bule", amestecarea în interiorul mediului de cultură se realizează fără agitare mecanică. Bioreactoarele

"air-lift" sunt adesea preferate pentru culturi de celule vegetale sau animale sau de celule imobilizate, pentru că nivelul forfecării în acest tip de bioreactor este semnificativ mai mic decât în vasele agitate.

Există mai multe tipuri de bioreactoare "air-lift". Ele se diferenţiază net de cele tip "coloană cu bule", datorită separării curentului de lichid ascendent de cel descendent.

Bioreactoarele "air-lift" sunt în unele cazuri sub forma unor turnuri cu buclă. În acest tip de bioreactor, circulaţia lichidului se datorează diferenţei de densitate a fazelor aerate din turn şi a zonelor neaerate. O diferenţă mai mare de densitate (sau conţinut în gaz) şi o înălţime mai mare a coloanei implică o viteză de circulaţie mai mare. Teoria de optimizare a reactoarelor "air-lift" este tratată în multe lucrări ştiinţifice publicate. În practică se utilizează câteva construcţii de bază:

– "air-lift" cu circulaţie internă, în care caz reactorul turn este divizat în două regiuni cu ajutorul unui tub axial (numit draft) sau cu un plan vertical. Doar o singură regiune este aerată, cealaltă servind drept buclă (fig. 6.25, *a* şi *b*);

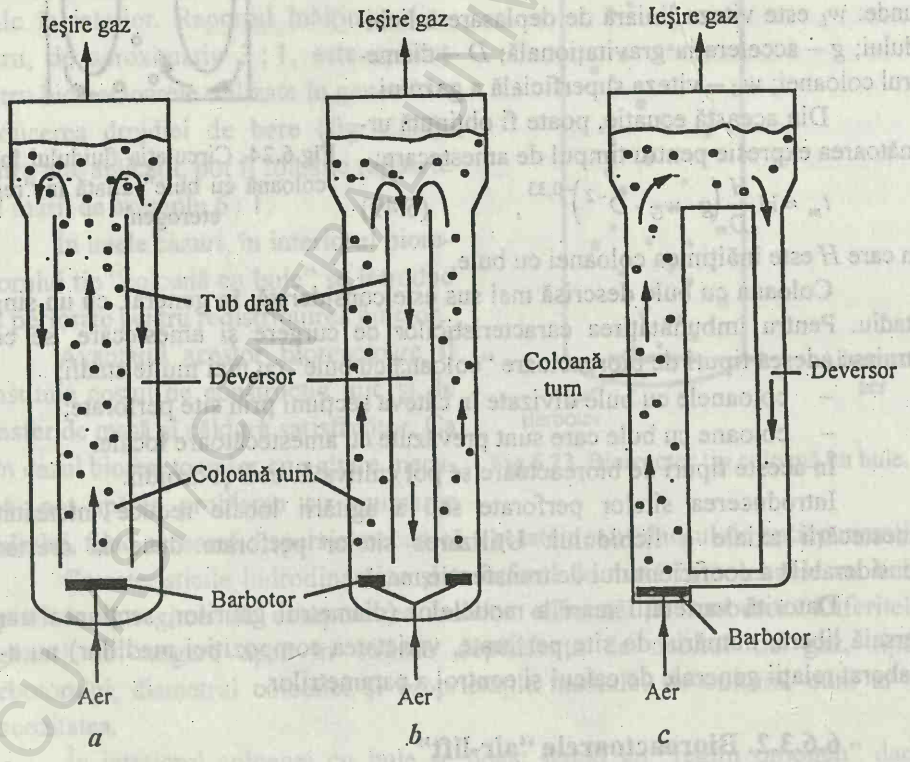


Fig. 6.25. Configuraţia bioreactoarelor "air-lift":
a, *b* – bioreactoare "air-lift" cu o singură regiune aerată;
c – bioreactor "air-lift" cu circulaţie externă.

– "air-lift" cu circulaţie externă, care constă din două coloane, cea cu diametru mai mare (turn) fiind aerată, fluxul de lichid întorcându-se în cea cu diametru mai mic (fig.6.25, *c*)

Deoarece turnul şi deversorul sunt separate în bioreactorul cu circulaţie externă, degajarea aerului este mai eficientă decât în cel cu circulaţie internă (cu buclă internă). Mai multe bule intră în deversor şi diferenţa de densitate a fluidului din turn respectiv din deversor, este mai mare şi astfel viteza de circulaţie a lichidului în vas este mai mare. În concluzie, amestecarea este mai bună în bioreactorul cu buclă externă decât în cel cu buclă interioară.

În general, amestecarea este oricum mai bună în bioreactoarele "air-lift" decât în cele tip "coloană cu bule". Din acest motiv în tratamentul biologic al nămolurilor se preferă bioreactoare de tip "air-lift",asemănătoare celui reprezentat în figura 6.26.

Bioreactoarele "air-lift" sunt mult utilizate în biosinteza proteinelor monocelulare utilizate în hrana animalelor. Un model de bioreactor "air-lift" (existent în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti, secţia Biosinteze) poate fi urmărit în figura 6.26.

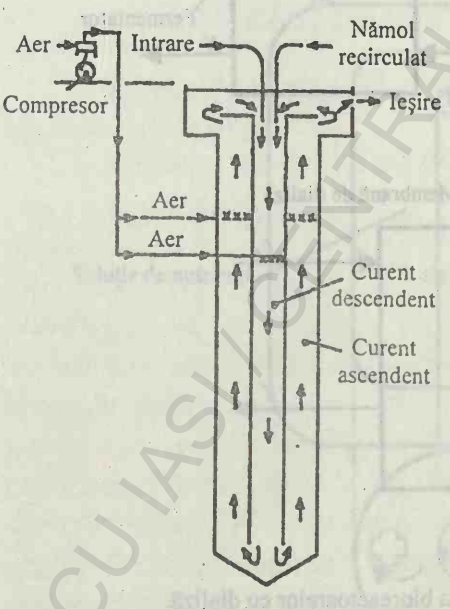


Fig.6.26. Bioreactor "air-lift" pentru tratamentul nămolurilor (adaptat după Hines ş.a., 1975).

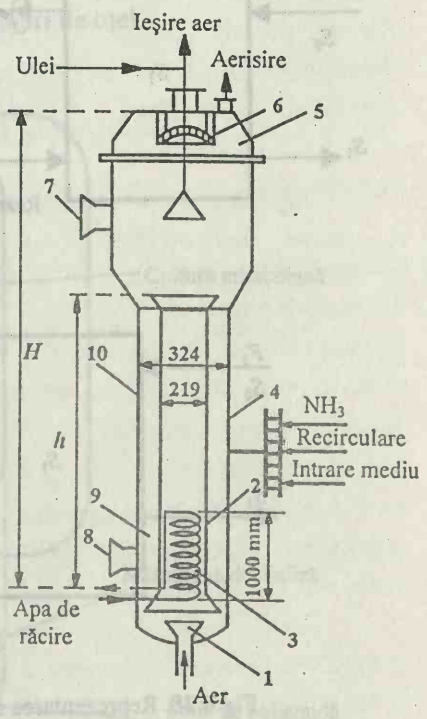


Fig.6.27. Bioreactor "air-lift" cu serpentine de răcire utilizat în biosinteza proteinelor microbiene(existent la ICCF).

6.6.4. Bioreactoare cu dializă

Utilizarea membranelor de dializă în reactoarele biologice şi biochimice are două raţiuni:

– membranele de dializă sunt un mijloc eficient pentru îndepărtarea continuă a inhibitorilor sau a produselor toxice rezultate în timpul fermentaţiei;

– cultura microbiană poate fi alimentată cu substrat prin membrană.

În acest fel, se pot obţine concentraţii mari de microorganisme, deoarece substratul este separat de microorganism şi nu îl inhibă.

Bioreactoarele cu dializă sunt de mare importanţă pentru cultivarea celulelor umane, întrucât astfel pot fi îndepărtaţi produşii de inhibiţie, cum ar fi lactatul şi se poate aproviziona sistemul de celule umane cu soluţie de nutrienţi. De asemenea, sisteme de două sau mai multe tipuri de microorganisme pot fi cultivate în reactoare cu dializă.

Exemplificăm prin două tipuri de astfel de reactoare (fig. 6.28):

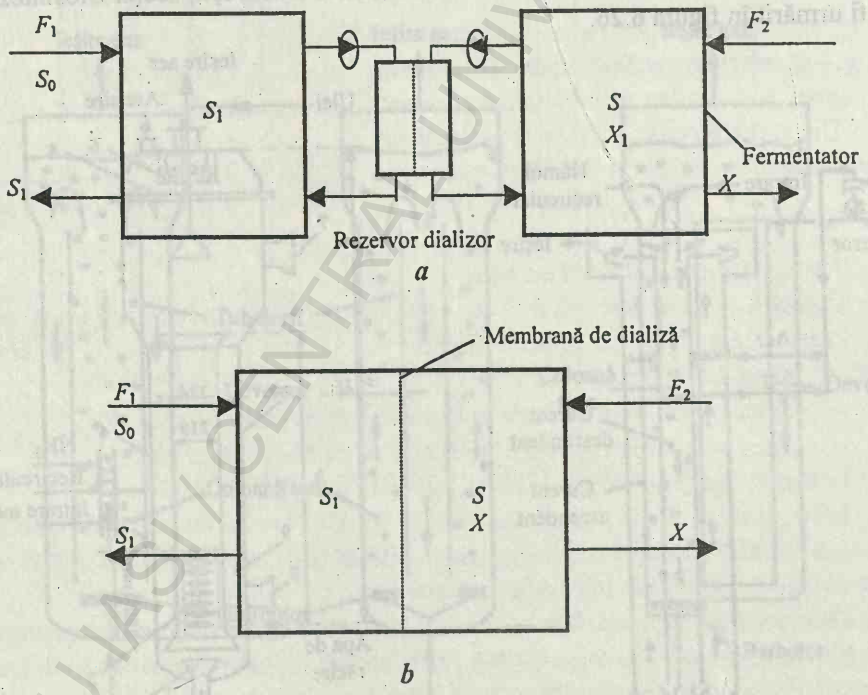


Fig.6.28. Reprezentarea schematică a bioreactoarelor cu dializă.

Tipul *a* constă în două vase. Schimbul de substrat sau produs este efectuat prin pomparea conţinutului vasului printr-un modul de dializă separat. Se poate

utiliza un fermentator standard şi separat un modul de dializă. Acest sistem are o serie de dezavantaje. Astfel, sterilizarea acestui sistem multi-component nu este fără probleme. Suspensia fermentată trebuie să fie pompată prin by-pass, unde este dificil să se controleze creşterea celulelor. Alimentarea cu nutrienţi şi gaze, descărcarea produselor metabolice şi stresul mecanic al celulelor viabile în timpul pompării constituie un neajuns. Din acest motiv se preferă tipul *b*.

Reactorul de tip *b* poate fi sterilizat "in situ" ca un fermentator obişnuit.

Principiul de funcţionare este simplu. Două tuburi flexibile sunt fixate de fund şi de capac, în interiorul bioreactorului de oţel (fig.6.29).

Materialul din care este confecţionat tubul mare, care formează peretele fermentatorului, este din folie de poliamidă (grosimea porilor este de 80 μm). Al doilea tub mic formează un cilindru în interiorul reactorului. Acest al doilea tub este o membrană de dializă permeabilă, cu dimensiunea porilor de 20 μm.

Reactorul este echipat cu două unităţi de agitare, având motoare separate. Turaţia celor două motoare este controlată separat. Sistemul este foarte flexibil. Aeraţia poate fi instalată în ambele camere în acelaşi timp. Fermentatorul se sterilizează cu mediu, la 121°C, în mod obişnuit. În timpul sterilizării, pereţii din folie sunt protejaţi de o manta formată din doi cilindri de oţel.

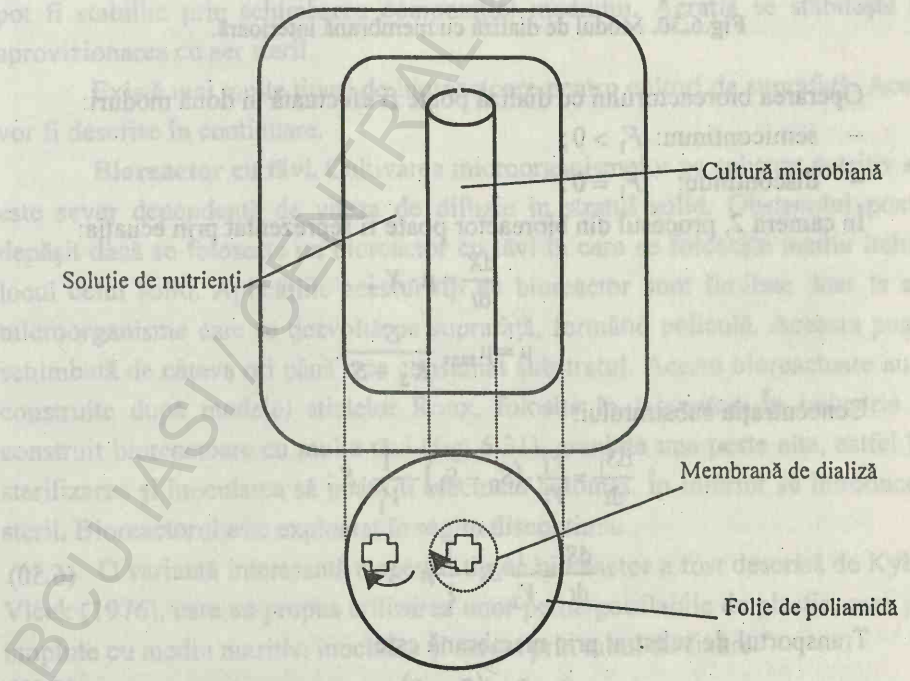


Fig.6.29. Bioreactor cu dializă.

Modelarea matematică a procesului din bioreactorul cu dializă se poate efectua cu ajutorul ecuțiilor Monod prezentate anterior pentru alte tipuri de bioreactoare (fig.6.30).

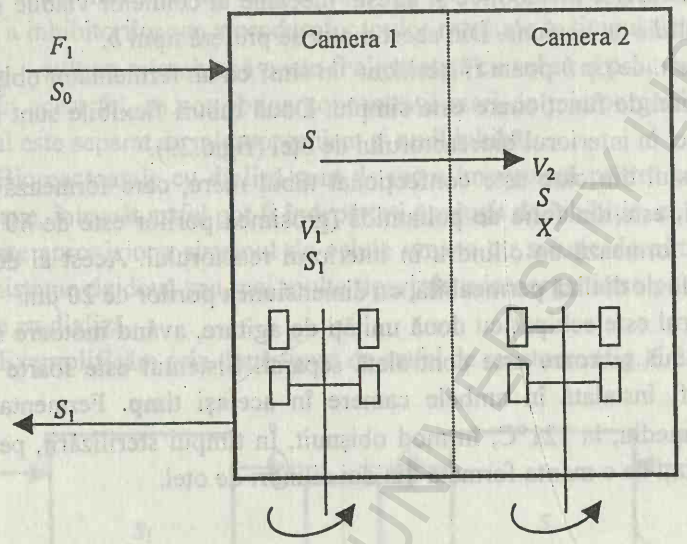


Fig.6.30. Modul de dializă cu membrană interioară.

Operarea bioreactorului cu dializă poate fi efectuată în două moduri:

- semicontinuu: $F_1 > 0$;
- discontinuu: $F_1 = 0$.

În camera *2*, procesul din bioreactor poate fi reprezentat prin ecuația:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X;$$

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_S + S}.$$

Concentrația substratului:

$$\frac{dS_1}{dt} = \frac{F_1}{V_1} \cdot (S_0 - S_1) - \frac{1}{V_1} \cdot S;$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{1}{V_2} S - \frac{1}{Y} \mu \cdot X. \qquad (6.50)$$

Transportul de substrat prin membrană este:

$$S = P \cdot A(S_1 - S), \qquad (6.51)$$

unde A este suprafața membranei şi P – coefientul de permeabilitate al membranei.

6.7. BIOREACTOARE PENTRU CULTURI DE SUPRAFAȚĂ

Din punct de vedere istoric, reactoarele pentru culturi de suprafață au fost primele sisteme de fermentație utilizate. În timp ce pentru reactoarele submerse este nevoie de aprovizionarea continuă cu energie în scopul menținerii interfeței gaz-lichid, reactoarele pentru culturi de suprafață nu depind de sistemul exterior decât în mică măsură. Aceste bioreactoare sunt utilizate pentru microorganisme cultivate pe medii solide și semisolide, sau pe straturi lichide aflate în repaos.

Culturile microbiene pe substraturi nutritive solide sunt utilizate mai mult în laborator pentru întreținerea culturilor, decât industrial, pentru biosinteză.

În cazul culturilor de suprafață, microorganismele se dezvoltă pe suprafața unui suport lichid sau solid, iar în cazul culturilor solide, microorganismul se dezvoltă atât în suprafață cât și în interiorul mediului de cultură.

Mediul nutritiv la care s-a adăugat un agent gelifiant se usucă la 45...50°C și se inoculează la temperatura ambiantă cu spori, de exemplu. Coloniile formate după incubare permit selecția microorganismelor potrivite. Condițiile de cultivare pot fi stabilite prin schimbarea compoziției mediului. Aerația se stabilește prin aprovizionarea cu aer steril.

Există mai multe tipuri de bioreactoare pentru culturi de suprafață. Acestea vor fi descrise în continuare.

Bioreactor cu tăvi. Cultivarea microorganismelor pe substrat nutritiv solid este sever dependentă de viteza de difuzie în stratul solid. Obstacolul poate fi depășit dacă se folosește un bioreactor cu tăvi în care se folosește mediu lichid în locul celui solid. Aplicațiile acestui tip de bioreactor sunt limitate doar la acele microorganisme care se dezvoltă pe suprafață, formând peliculă. Aceasta poate fi schimbată de câteva ori până este consumat substratul. Aceste bioreactoare au fost construite după modelul sticlelor Roux, folosite în laborator. În industrie s-au construit bioreactoare cu multe tăvi (fig. 6.31), aranjate una peste alta, astfel încât sterilizarea și inocularea să poată fi efectuate automat. În interior se introduce aer steril. Bioreactorul este exploatat în regim discontinuu

O variantă interesantă a acestui tip de bioreactor a fost descrisă de Kybal și Vlcek (1976), care au propus utilizarea unor perne gonflabile de plastic, care pot fi umplute cu mediu nutritiv, inoculate și aerate prin tubul de fixare.

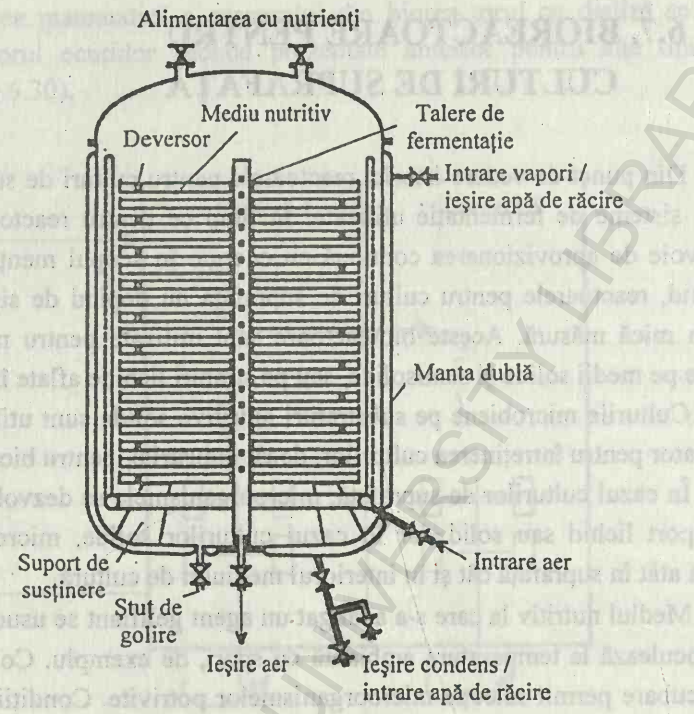


Fig. 6.31. Bioreactor cu tăvi, sterilizabil, cu răcire, cu alimentare pe la partea superioară.

Bioreactoare tip coloană cu umplutură. Aceste bioreactoare se folosesc cu biocatalizatori granulați sau imobilizați. Reactorul constă dintr-o coloană, verticală, umplută cu granule de biocatalizator. Aparatul este alimentat cu mediu prin partea de sus și formează o fază de lichid continuă printre particule. Deteriorarea celulelor, datorită frecării particulelor, este minimă comparativ cu bioreactoarele cu agitare.

Bioreactoarele cu umplutură se folosesc și pentru enzime imobilizate sau celule imobilizate (în acest caz fiind numite reactoare biochimice).

Transferul de masă dintre faza lichidă și catalizatorul solid este facilitat dacă viteza de trecere a acestuia prin coloană este mai mare. Pentru a îmbunătăți transferul de masă, de cele mai multe ori mediul lichid este recirculat așa cum este arătat în fig. 6.32.

De asemenea, aerarea mediului este bine să fie făcută separat. Dacă aerul este barbotat direct, se produce coalescența bulelor, apar canale prin umplutură și distribuția nu este uniformă. Din același motiv, bioreactoarele cu umplutură nu sunt potrivite pentru bioprocesele din care rezultă CO_2 sau alte gaze.

Aerul circulă, de obicei, în contracurent cu lichidul pentru a intensifica înlăturarea căldurii degajate în timpul fermentației sau a reacției enzimatice.

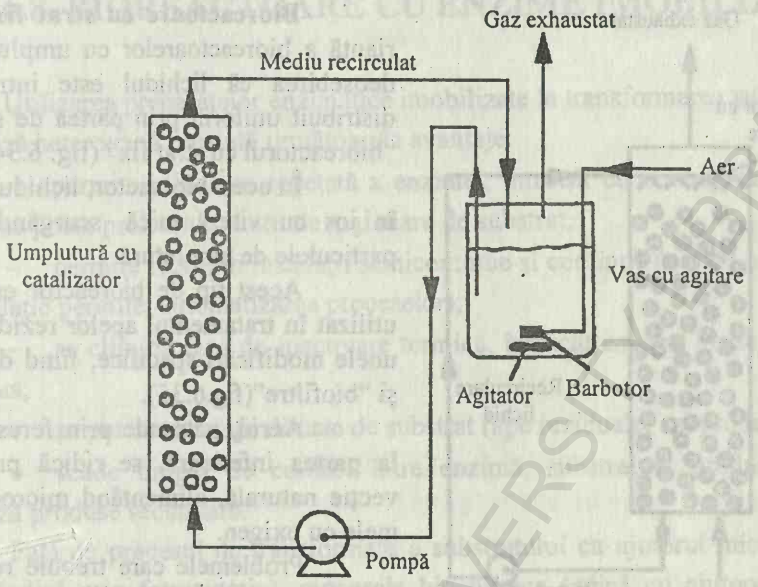


Fig. 6.32. Bioreactor tip "coloană cu umplutură" cu recircularea mediului.

Când se lucrează cu microorganisme, acestea formează un "film biologic" în jurul particulelor de umplutură.

Bioreactoare în strat fluidizat. În categoria reactoarelor de suprafață intră și reactoarele cu strat fluidizat.

Moebus (1981) descrie fermentația glucozei la etanol în strat fluidizat constând din granule de drojdie. Gazul de fluidizare păstrează în același timp granulele în mișcare și le usucă.

Când reactorul cu umplutură este operat cu stratul în suspensie, atunci el se numește "în pat fluidizat" sau "strat fluidizat" (fig.6.33).

Aerul este introdus pe la partea de jos și menține în suspensie cultura de celule imobilizate sau de enzime imobilizate. Uneori se folosește nisip sau alt material care se amestecă cu celulele microbiene. Procedeul este uneori folosit cu microorganisme floculate, în fabricarea berii sau oțetului.

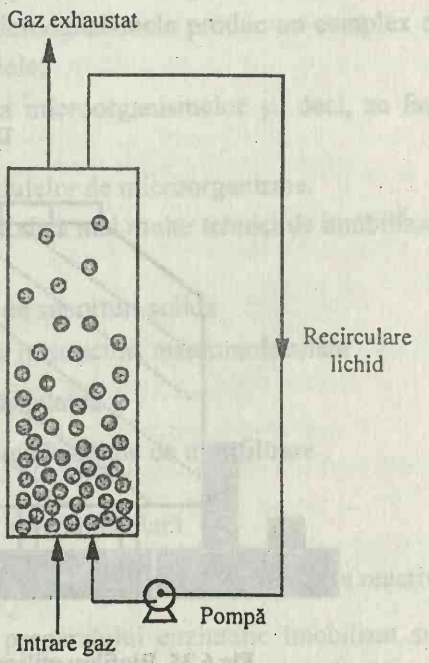


Fig.6.33. Bioreactor în pat fluidizat.

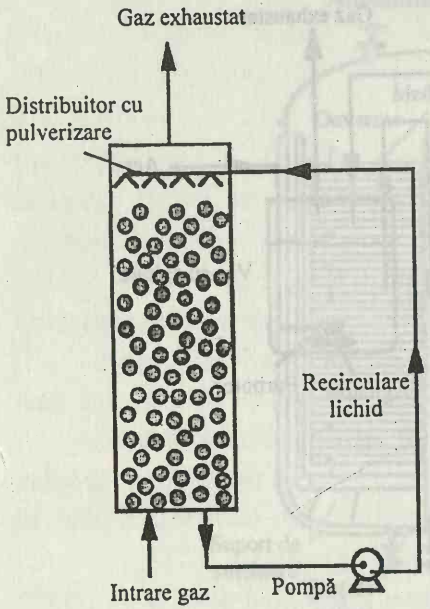


Fig. 6.34. Bioreactor cu strat fix.

Bioreactoare cu strat fix. O variantă a bioreactoarelor cu umplutură, cu deosebirea că lichidul este introdus și distribuit uniform prin partea de sus, este "bioreactorul cu strat fix" (fig. 6.34).

În acest bioreactor, lichidul circulă în jos cu viteză mică, scurgându-se pe particulele de umplutură.

Acest tip de bioreactor este mult utilizat în tratamentul apelor reziduale, cu unele modificări specifice, fiind denumite și "biofiltre"(fig.6.35).

Aerul, pătrunde prin ferestrele de la partea inferioară, se ridică prin convecție naturală, alimentând microorganismele cu oxigen.

Problemele care trebuie rezolvate pentru acest reactor sunt: utilizarea volumului reactorului în scopul creării unei interfețe cât mai mari și repartizarea uniformă a lichidului peste umplutură, pentru ca întreaga suprafață de lichid să lucreze uniform.

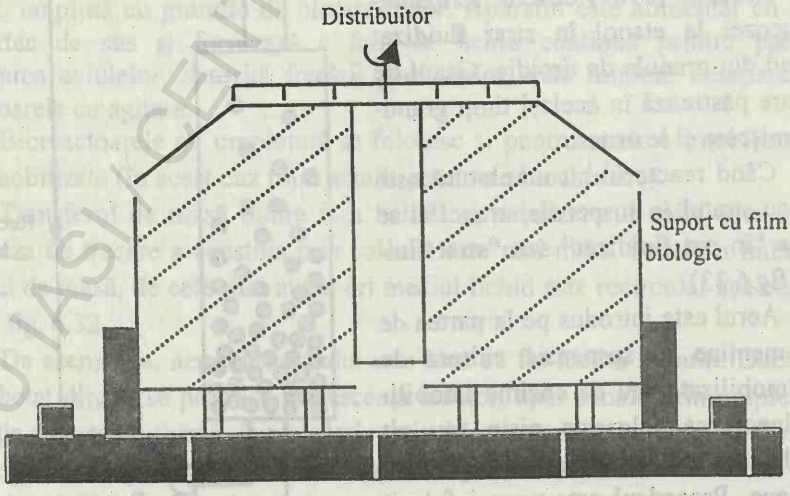


Fig.6.35. Biofiltru utilizat la purificarea apelor reziduale.

BCU IASI CENTRALA

6.8. BIOREACTOARE CU ENZIME IMOBILIZATE

Utilizarea preparatelor enzimatice imobilizate la transformarea substanţelor în cataliză heterogenă prezintă următoarele avantaje:

– permite utilizarea repetată a enzimei, întrucât cu aceeaşi cantitate de enzimă se poate prelucra o cantitate mai mare de substrat;

– permite lucrul în instalaţii semicontinue şi continue (volum mic ocupat de instalaţie permite, automatizarea proceselor);

– se elimină faza de inactivare termică, întrucât enzima nu se regăseşte în produs;

– se pot trata soluţii diluate de substrat (ape reziduale, subproduse);

– scade timpul de contact între enzimă, substrat şi produse; nu se formează produse secundare.

Faţă de procesul de transformare a substratului cu ajutorul microorganismelor (adică prin fermentaţie), procesele biochimice (adică cu ajutorul enzimei separate de sistem) prezintă următoarele avantaje:

– utilizarea pentru transformare a întregii cantităţi de substrat (în primul caz cel puţin 1% este folosit la dezvoltarea microorganismelor);

– posibilitatea efectuării unei reacţii enzimatice specifice datorită existenţei unei singure enzime; în primul caz microoganismele produc un complex de enzime, care poate duce la transformări paralele;

– se elimină fazele de cultivare a microorganismelor şi, deci, se face economie de materii prime.

Există şi posibilitatea imobilizării celulelor de microorganisme.

Tehnici de imobilizare a enzimei. Există mai multe tehnici de imobilizare a enzimei:

– procedee fizice
  – adsorbţia pe suporturi solide
  – includerea în structuri macromoleculare
  – microîncapsularea
  – imobilizarea în celule de ultrafiltrare

– procedee chimice
  – reticulare intermoleculară
  – legarea covalentă de suporturi insolubile reactive

Caracteristicile de reactivitate ale preparatului enzimatic imobilizat sunt influenţate de materialul utilizat ca suport prin: zona proceselor de difuziune din

imediata vecinătate a particulei de catalizator; modificarea sterică la centrii activi, geometria moleculară a suportului; flexibilitatea structurii sale, caracterul său hidrofil.

În timpul procesului de imobilizare, proteina enzimatică poate suferi unele modificări de conformație sau modificarea chimică a resturilor de aminoacizi, implicate în procesul de cuplare.

În procesul de imobilizare, o parte din activitatea enzimatică se pierde. Bilanțul de activitate este:

$$A_0 = A_1 + A_2 + A_3, \tag{6.52}$$

unde: A_0 este activitatea enzimatică inițială, în U/g;

A_1 – activitatea enzimatică regăsită în preparatul imobilizat, în U/g;

A_2 – activitatea enzimatică regăsită în mediul de cuplare;

A_3 – activitatea enzimatică pierdută în procesul de imobilizare.

Cauzele pierderii de activitate sunt următoarele:

– participarea la reacția de cuplare a unor resturi de aminoacizi din situsul catalitic;

– împiedicarea sterică a accesului substratului la centrii activi;

– modificările produse în conformația proteinei enzimatice;

– împiedicarea fenomenului de transport datorat difuziei.

Randamentul de imobilizare este:

$$\eta = 100 \cdot \frac{A_1}{A_0}. \tag{6.53}$$

Randamentul total de menținere a activității este:

$$\eta = 100 \cdot \frac{A_1 + A_2}{A_0}. \tag{6.54}$$

Cantitatea de proteină enzimatică cuplată la un suport variază între 1 mg proteină / g preparat imobilizat, până la 1 g proteină / g preparat imobilizat.

Reactivitatea preparatelor imobilizate este influențată de următorii factori:

– *granulometria* lor: activitatea specifică este adeseori invers proporțională cu diametrul mediu al particulelor;

– *masa moleculară* a substratului: difuziunea și împiedicările sterice limitează accesibilitatea substraturilor cu masă moleculară ridicată, la centrii activi ai catalizatorului enzimatic;

– *limitările difuzionale*

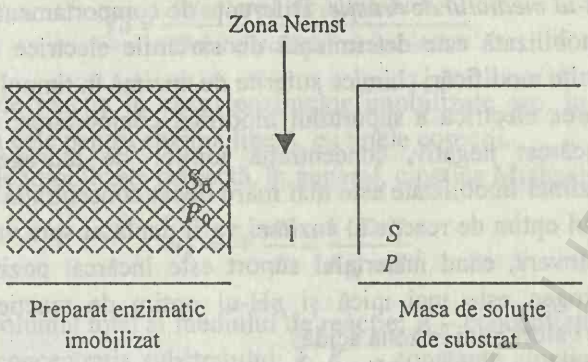


Fig.6.36. Mecanismul de difuzie a substratului la enzima imobilizată (după Oniscu, 1972).

Procesele elementare implicate în transformarea substratului pentru catalizatorul enzimatic în stare liberă, respectiv imobilizată sunt:

– pentru enzima solubilă:

$$E + S \xrightarrow{K_m} ES \xrightarrow{k_{cat}} E + P$$

– pentru preparat enzimatic imobilizat:

$$E + S_0 \xrightarrow{K'_m} ES \longrightarrow E + P_0$$

în care: S şi S_0 sunt concentraţiile de substrat în mediul de reacţie, respectiv în microvecinătatea catalizatorului; P şi P_0 – concentraţiile de produs în mediul de reacţie, respectiv în microvecinătatea catalizatorului.

Particulelele de preparat enzimatic imobilizat sunt înconjurate de o zonă de solvent neagitată (zona Nernst) în care se stabilesc gradiente de concentraţie a substratului $S \rightarrow S_0$ şi a produsului $P_0 \rightarrow P$(fig.6.36) Saturarea catalizatorului enzimatic în faza solidă se produce la concentraţii de substrat mai mari decât în cazul enzimei solubile native; valoarea constantei lui Michaelis creşte de la K_m (pentru enzima solubilă) la K'_m (pentru preparatul imobilizat). Reducerea zonei neagitate prin metode fizice (măcinare, agitare energică) determină micşorarea acestor gradiente de concentraţii şi, deci, a diferenţelor dintre K_m şi K'_m.

Pentru viteza specifică superficială de reacţie se poate scrie relaţia:

$$v' = \frac{D}{l}(S - S_0) = \frac{v'_m \cdot S_0}{K_m + S_0}, \qquad (6.55)$$

unde: v' este viteza specifică superficială de reacţie, în moli/cm^2·s; D – coeficientul de difuziune al substratului; l – grosimea zonei neagitate; v'_m – viteza specifică superficială maximă de reacţie, în moli/cm^2·s; S, S_0 – concentraţia substratului în moli/cm^3;

– *p*H-*ul mediului de reacţie*. Diferenţa de comportament a enzimei libere faţă de cea imobilizată este determinată de sarcinile electrice ale materialului-suport, de anumite modificări chimice suferite de enzimă în timpul cuplării.

Încărcarea electrică a suportului modifică comportarea: când materialul-suport este încărcat negativ, concentraţia ionilor de hidrogen din imediata vecinătate a enzimei imobilizate este mai mare decât concentraţia lor în mediul de reacţie, iar *p*H-ul optim de reacţie al enzimei va fi deplasat spre valori mai mari în zona alcalină. Invers, când materialul suport este încărcat pozitiv, concentraţia ionilor de hidrogen este mai mică şi *p*H-ul optim de reacţie al enzimei se deplasează spre valori mici în zona acidă;

– *stabilitatea preparatelor enzimatice imobilizate*. De obicei, stabilitatea termică, stabilitatea la depozitare, stabilitatea faţă de denaturanţi a enzimelor cresc prin imobilizarea acestora, în special la preparatele obţinute prin cuplare covalentă. Sporul de stabilitate este determinat de faptul că, în urma imobilizării, structura conformaţională a proteinei enzimatice este mai puţin sensibilă la acţiunea factorilor externi.

Elemente de calcul al reactoarelor cu enzime imobilizate. Reactoarele conţinând preparate enzimatice imobilizate se clasifică în:

– discontinue cu agitare;
– continue cu agitare;
– continue de tip coloană;
– continue în pat fluidizat.

Alegerea tipului de reactor depinde de caracteristicile mecanice ale preparatului imobilizat, de capacitatea de producţie a instalaţiei, de natura substratului ce trebuie transformat.

Din punct de vedere al sistemului de calcul, se menţin tipurile ideale: cu amestecare totală sau flux tip piston.

Pentru reactoarele cu enzime imobilizate se calculează timpul de staţionare definit astfel:

– pentru reactoarele discontinue:

$$TS = \frac{Cantitatea\ de\ preparat\ imobilizat \times Timpul\ de\ reacţie}{Volum\ mediu\ de\ reactie};$$

$$TS = \frac{Activitatea\ enzimatică\ totală \times Timpul\ de\ reacţie}{Volum\ mediu\ de\ reacţie};$$

– pentru reactoarele continue:

$$TS = \frac{Cantitatea\ de\ preparat\ imobilizat}{Debitul\ soluţiei\ de\ substrat};$$

$$TS = \frac{\textit{Activitatea enzimatică totală}}{\textit{Debitul soluției de substrat}}.$$

Viteza de reacție în cazul enzimelor imobilizate are, în general, forme asemănătoare cu cele pentru enzima liberă, cu unele corecții.

Enzimele imobilizate respectă, în general, cinetica Michaelis-Menten.

$$v_R = -V\frac{dS}{dt} = \frac{k \cdot E \cdot S}{K_m + S}, \tag{6.56}$$

în care: V este volumul total al mediului de reacție; E – concentrația catalizatorului enzimatic; S – concentrația substratului; k, K_m – constante cinetice; t – timpul de reacție.

Activitatea preparatelor imobilizate descreşte, în timp, într-unul din următoarele moduri:

– inactivare de tip exponențial;

– inactivare dublă: în stadiile inițiale, moleculele de enzimă slab legate de catalizator sunt antrenate pe soluția de substrat; ulterior se produce o inactivare termică propriu-zisă;

– inactivare fizică, prin colmatarea porilor catalizatorului, eluarea enzimei din structura preparatului imobilizat, degradarea preparatului prin eroziune;

– inactivarea dependentă de concentrația substratului;

– în funcție de *p*H, prezența şi concentrația activatorilor sau inhibitorilor.

Efectul scăderii activității catalizatorului este scăderea conversiei substratului (fig.6.37).

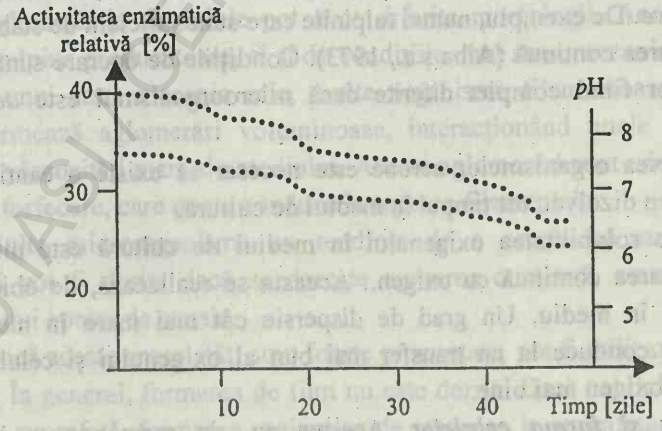


Fig.6.37. Stabilitatea în timp a activității preparatului enzimatic imobilizat.

Pentru a evita scăderea producției, se cuplează mai multe reactoare în serie. De exemplu, se utilizează în acest scop o serie de trei reactoare exploatate astfel: la începutul reacției primului reactor al seriei este umplut cu catalizator proaspăt și parcurs de fluxul de substrat; pe măsura scăderii activității catalizatorului, în al doilea reactor al seriei se adaugă continuu catalizator proaspăt, în așa fel încât activitatea totală a sistemului să rămână constantă, iar fluxul de substrat parcurge ambele reactoare, cu același debit. Volumele reactoarelor sunt calculate în așa fel încât, atunci când al doilea reactor se umple cu catalizator, activitatea primului a devenit practic nulă. Începe adaosul de catalizator în al treilea, primul reactor al seriei se golește, fiind pregătit pentru un nou ciclu de funcționare. Astfel, tot timpul, debitul de substrat și raportul de conversie rămân constante.

Se pot utiliza și alte scheme:

- debit constant și conversie variabilă;
- reactoare legate în paralel (recomandabil la capacități mari).

6.9. ALEGEREA BIOREACTOARELOR

Alegerea bioreactorului potrivit pentru un anumit proces biotehnologic se realizează în funcție de o serie de factori predeterminați cum ar fi: natura microorganismului folosit, proprietățile mediului de cultură, parametrii biochimici ai procesului, amplasamentul bioreactorului.

Caracteristici determinate de natura microorganismului folosit în bioproces. Modul de operare al unui reactor depinde în mod esențial de *stabilitatea tulpinii productive*. De exemplu, numai tulpinile care sunt suficient de stabile pot fi utilizate în operarea continuă (Aiba ș.a., 1973). Condițiile de operare sunt afectate în mod hotărâtor fiind complet diferite dacă microorganismul este *aerob* sau *anaerob*.

În creșterea organismelor aerobe este necesar să existe o cantitate disponibilă de oxigen dizolvat, tot timpul în mediul de cultură.

Deoarece solubilitatea oxigenului în mediul de cultură este mică, este necesară alimentarea continuă cu oxigen.. Aceasta se realizează, de obicei, prin dispersia aerului în mediu. Un grad de dispersie cât mai mare în mediile cu vâscozitate mare conduce la un transfer mai bun al oxigenului și celulele sunt aprovizionate cu oxigen mai bine.

Mărimea și forma celulelor. Acestea au, de asemenea, o influență considerabilă asupra tipului de reactor necesar și a modului de operare. Celulele

sferice sunt, de obicei, mai mici şi mai puţin sensibile la forfecare decât microorganismele filamentoase.

Formarea celulelor sferice necesită un grad de dispersie mai mare a aerului decât organismele filamentoase. Dimensiunile mici asigură un raport mare între suprafaţă şi volum, un consum mai mare al substratului şi, de asemenea, o creştere rapidă. Celulele aerobe cu viteză mare de creştere necesită un consum al oxigenului mai mare.

Organismele filamentoase cresc numai la capătul hifelor. Aceasta conduce la viteze mici de creştere şi la cereri mici în oxigen. Deoarece astfel de celule sunt, de cele mai multe ori, sensibile la forfecare, forţe mari de dispersie pot cauza ruperea. De fapt, este de dorit să se disperseze nu numai faza gazoasă ci şi microorganismul însuşi.

Formarea de micelii şi aglomerări are un efect considerabil asupra alegerii reactorului. Aglomerările de celule au un raport mic între suprafaţă şi volum, o viteză mică de consum a substratului şi o viteză mică de creştere.

Viteza mică de consum a oxigenului permite folosirea reactoarelor care dispersează aerul într-un grad mic sau moderat.

Celulele care formează aglomerări sunt uşor de separat din mediile de cultură şi reintroduse în reactor în scopul ridicării densităţii celulare. În multe reactoare, densitatea celulară se diminuează considerabil cu creşterea înălţimii (de exemplu, reactoarele turn). Când ieşirea mediului este plasată la capătul reactorului, numai o cantitate mică de celule sunt îndepărtate din turn. În acest fel, timpul de staţionare a celulelor în reactor poate fi extins considerabil, fără creşterea timpului de staţionare în mediu. Deci, aglomerarea de celule permite operarea în sistem continuu a reactorului de producere a metaboliţilor, fără o separare specială a celulelor (de exemplu, prin centrifugare sau filtrare).

Aglomerările de celule pot avea diferite morfologii. Acestea depind nu numai de tulpina producătoare, ci şi de condiţiile unui stres mecanic din reactor. În condiţiile unui stres mecanic mic, multe organisme filamentoase (de exemplu, fungii) formează aglomerări voluminoase, interacţionând unele cu altele, care conduc la vâscozităţi mari ale mediului. Aceste aglomerări sunt adesea sensibile la stresul de forfecare, care poate conduce la ruperea filamentelor.

Multe microorganisme au tendinţa de a creşte pe suprafeţe. Aceste proprietăţi pot fi dorite dacă se doreşte operarea continuă, cum ar fi în cazul tratamentului apelor de canal.

Dacă aceste proprietăţi sunt foarte pronunţate, pot fi utilizate reactoarele de suprafaţă. În general, formarea de film nu este dorită. Dacă celulele au tendinţa să crească la suprafaţă, formarea regiunilor de stagnare la suprafaţă poate fi evitată prin utilizarea unui reactor potrivit.

Caracteristici ale reactoarelor determinate de proprietăţile mediului de cultură. Caracteristicile mediilor de cultură determină alegerea unui anumit tip de bioreactor.

Proprietăţile fizice ale substratului folosit diferă: gazos (de exemplu, metan, dioxid de carbon, la fotosinteză), lichid şi solubil în apă (de exemplu, glucoză, lactoză), lichid şi insolubil în apă (de exemplu, parafine), solid şi insolubil în apă (de exemplu, amidon, celuloză). Fiecare stare fizică exercită o influenţă considerabilă în alegerea bioreactorului. De aceea, de exemplu, metanul şi aerul pot forma un amestec exploziv şi reactoarele cu acest amestec nu pot fi folosite.

În cazul substraturilor volatile, se alege un reactor cu debit în contracurent, cu agitare uşoară axială sau un sistem de reactoare cu mai multe stagii pentru a micşora pierderile de gaz. S-a studiat, de asemenea, aeraţia emulsiilor de ulei în apă. Prezenţa parafinelor reduce viteza de transfer a oxigenului. În general, reactoarele de suprafaţă nu sunt potrivite pentru fermentaţia emulsiilor uleioase.

Dacă se utilizează un substrat solubil în apă, în operarea discontinuă, se obţine, de obicei, un mediu mult mai vâscos decât cel iniţial.Pentru acest caz se folosesc reactoare speciale cu agitatoare elicoidale. Prezenţa solidelor grele (de exemplu carbonatul de calciu în mediul de cultură pentru *Penicillum chrysogenum*) ori a substraturilor fibroase (de exemplu paie pretratate) limitează alegerea tipului de bioreactor. Fibrele lungi din suspensiile diluate micşorează debitul şi particulele mari blochează intrările. În acest caz este necesară introducerea de restricţii la prepararea mediilor; se prevăd faze speciale de înlăturare a neajunsurilor.

O altă componentă a mediului care poate influenţa tipul de bioreactor ce urmează a fi utilizat este concentraţia de substrat sau de produs finit.

Efectul biocinetic al substratului sau al produsului pot să afecteze alegerea bioreactorului. În cazul în care substratul prezintă inhibiţie sau represie asupra creşterii microorganismului, procesul este condus în sistem semicontinuu, cu alimentare continuă de substrat (fermentaţie cu adaosuri).

În cazul în care produsul de biosinteză induce inhibiţie sau represie când sunt în concentraţie mare (de exemplu, glucoza şi celobioza la *Trichoderma viride*, etanolul la *Sacharomyces cerevisiae*), este de dorit să se folosească aranjamentul în mai multe trepte.

O altă caracteristică, ce influenţează alegerea unui anumit tip de bioreactor sau a unui anumit sistem de operare, o constituie prezenţa în mediul de cultură a unei componente care se degradează în timpul operaţiei de sterilizare (termolabile). În acest caz este necesară sterilizarea separată a acestor materiale.

O altă proprietate a mediului de cultură care influenţează procesul de fermentaţie este tendinţa de coalescenţă, adică formarea de bule de gaz care micşorează transferul de oxigen în mediul de cultură. În acest caz se introduc în bioreactor sisteme de disipare a bulelor, cu efect local (mijloace mecanice).

Comportarea reologică a mediului are o mare influenţă asupra unui bioproces. Mediile cu vâscozitate mică nu creează probleme de agitare şi de viteză de transfer a oxigenului. O creştere a vâscozităţii mediului poate avea diferite cauze:

– concentraţia mare în substrat (în particular la operarea în sistem "batch", la începutul cultivării);

– secreţia de produse vâscoase pe parcursul biosintezei, cum ar fi pullulanul şi xantanul;

– morfologia microorganismului.

O caracteristică a mediului importantă, care implică alegerea unui anumit tip de bioreactor, este spumarea în timpul cultivării. Formarea de spumă conduce de cele mai multe ori la blocarea ieşirii aerului, inundarea filtrelor de aer, scăderea volumului de mediu în bioreactor, infecţia mediului de cultură şi, deci, compromiterea procesului de biosinteză.

Există mai multe metode pentru prevenirea fenomenului de spumare:

– conducerea procesului astfel încît să nu se formeze spumă; de exemplu o viteză mare de transfer a oxigenului (printr-o agitare corespunzătoare, variabilă în funcţie de nivelul concentraţiei de oxigen dizolvat măsurată continuu) transformă procesul într-unul cu limitare de substrat; în acest caz concentraţia oxigenului nu mai este un factor limitativ şi nu este necesară mărirea debitului de aer care conduce la spumare excesivă.Această metodă se poate aplica în cazul în care spumarea se datorează proteinelor dizolvate, eliberate din celulele lizate;

– adăugarea de antispumanţi, care schimbă coalescenţa mediului. Agentul antispumant se acumulează la interfaţa gaz-lichid şi împiedică formarea spumei.

Antispumanţii utilizaţi în industria de biosinteze sunt :

- uleiuri naturale: de soia, de floarea-soarelui;
- uleiuri sintetice, care pot fi de natură siliconică sau polimeri organici;
- mijloace mecanice: agitatoare cu turaţie mare, şicane, tuburi interioare.

Spumarea poate fi combătută şi prin alegerea tipului de bioreactor potrivit care să permită o circulaţie rapidă a lichidului fără să formeze spumă (bioreactor cu "draft" interior).

7 PRELUCRAREA MEDIILOR DE CULTURĂ ÎN SCOPUL IZOLĂRII ŞI PURIFICĂRII PRODUSELOR DE BIOSINTEZĂ

Înainte de a fi purificate, substanţele organice obţinute pe cale biotehnologică sunt în prealabil izolate din lichidul de cultură (dacă sunt extracelulare) sau din biomasă (dacă sunt intracelulare) într-o formă parţial purificată, aplicând metode de separare general valabile pentru toate produsele de biosinteză.

Prelucrarea primară a mediilor de biosinteză cuprinde operaţii aplicate, în general, în tehnologia chimică cum ar fi: filtrarea, centrifugarea, decantarea, concentrarea fazei lichide, dezagregarea celulelor, extracţia, uscarea, atomizarea. Se aplică, de asemenea, în procesele mai specifice cum ar fi: precipitarea cu solvenţi sau cu săruri anorganice, purificări şi concentrări prin ultrafiltrare.

Echipamentele industriale implicate sunt complexe şi specifice. Schema de flux variază de la un preparat la altul, în funcţie de tehnologie.

Separarea produselor din lichidul rezultat din fermentaţie constituie o problemă dificilă, indiferent de procedeul aplicat. Dificultăţile provin din faptul că produsele biologic active obţinute în general prin biosinteză sunt substanţe termolabile, ceea ce impune evitarea degradării sau modificării chimice a acestora.

Pentru a alege cea mai adecvată metodă de separare a produselor biosintetizate, este necesar să se cunoască proprietăţile fizico-chimice a acestora şi anume:

- *solubilitatea*:
  - în apă sau în soluţii diluate de săruri;
  - în solvenţi polari (metanol, etanol, acetonă);
  - în solvenţi slab-polari (cloroform, hidrocarburi);
- *stabilitatea în soluţie*, în funcţie de *p*H: efectul temperaturii; efectul soluţiilor tampon; efectul solvenţilor organici;
- *stabilitatea în stare solidă*, în funcţie de temperatură precum şi efectul umidităţii asupra produsului;
- *proprietăţile fizice*:
  - dializabilitatea prin membrane;
  - adsorbţia pe suprafeţe solide;
  - migrarea în câmp electric;
  - sedimentarea în ultracentrifuge;

– *proprietăţile chimice*:
  – stabilitatea faţă de diverse enzime;
  – stabilitatea la acţiunea unor agenţi chimici.

Pentru separarea produsului din mediile de biosinteză se aplică, în general, următoarele metode:
– extracţia cu solvenţi organici;
– separarea pe schimbători de ioni;
– cromatografia;
– adsorbţia.

În industria de biosinteze există însă metode de prelucrare integrală a mediului de cultură prin aplicarea diferitelor metode de uscare, produsul rezultat fiind utilizat ca atare. Acest mod de prelucrare a mediilor de biosinteză este mult aplicat în tehnologia aditivilor furajeri (conţinând aminoacizi, enzime, vitamine).

Operaţiile chimice cel mai des utilizate în biotehnologia enzimelor şi aplicate industrial sunt: filtrarea, concentrarea, dezagregarea celulară şi atomizarea.

7.1. FILTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ

Faţă de filtrarea substanţelor chimice, filtrarea mediilor de biosinteză ridică adesea probleme datorită compoziţiei chimice deosebit de complexe a mediilor şi apariţiei materialului biologic (bacterii, fungi) care complică fenomenul.

Operaţia de filtrare a mediilor de biosinteză este adeseori uşurată prin utilizarea adjuvanţilor de filtrare care formează în cursul operaţiei straturi microporoase micşorînd diametrul aparent al porilor şi implicit mărind eficienţa de colectare prin reţinerea unor particule de diametru mai scăzut. Utilizarea lor industrială conduce la mărirea vitezei de filtrare şi reducerea consumurilor de materiale. Ca mod de lucru se utilizează una din următoarele scheme :

– pe materialul filtrant (pânză de filtru, hârtie) se aplică un strat subţire de material adjuvant (prin filtrarea unei suspensii apoase de adjuvant). Prin patul filtrant astfel format se execută operaţia de filtrare;

– adjuvantul se amestecă cu suspensia de filtrat; se execută filtrarea recirculând primele porţiuni de filtrat până la limpezirea sa totală;

– raclarea permanentă a stratului de adjuvant, cu ajutorul unor cuţite speciale, astfel încât stratul de adjuvat de filtrare este menţinut la o valoare optimă, iar viteza de filtrare este menţinută constantă. Această variantă este aplicată în cazul filtrelor rotative.

O variantă a operaţiei de filtrare mult utilizată în biotehnologie este filtrarea sterilizantă.

La prelucrarea suspensiilor se face mai întâi o prefiltrare grosieră, urmată apoi de filtrarea sterilizantă propriu-zisă. Pentru filtrarea sterilizantă se montează în filtru plăcile (din acetat de celuloză, azbest sau polimeri sintetici) cu diametru redus al porilor, executând apoi în mod normal operaţia de filtrare.

7.2. DEZAGREGAREA CELULELOR DE MICROORGANISME

Când substanţele biologic active care interesează şi care s-au format în cursul procesului de biosinteză sunt intracelulare, este necesară distrugerea *membranei* celulare semipermeabile şi a peretelui protector în vederea recuperării componentelor respective. Această operaţie se realizează prin procedee de dezagregare.

După natura agentului de dezagregare utilizat, procedeele de dezagregare ale celulelor microbiene se clasifică în:

- procedee mecanice;
- procedee fizice nemecanice;
- procedee chimice;
- procedee enzimatice.

Procedeele mecanice cuprind dezagregarea celulelor în mori coloidale sau în mori vibratoare, menţinând un anumit raport de recirculare, până la dezagregarea totală a celulelor microbiene; în timpul operaţiilor de dezagregare mecanică are loc o creştere a temperaturii materialului biologic. Evitarea acestui fenomen şi menţinerea sistemului la o temperatură acceptabilă se efectuează prin circulaţia unui agent de răcire prin mantaua aparatului.

Dezagregarea celulelor de microorganisme prin procedee fizice, nemecanice, se poate efectua prin decomprimare rapidă, prin îngheţare lentă (datorită sporirii volumului apei la trecerea în stare solidă) sau prin şoc osmotic. Un procedeu deosebit de eficace este aplicarea de vibraţii ultrasonice suspensiei de celule. Vibraţiile cu frecvenţe de cca 20 000 Hz determină dezintegrarea celulelor microbiene.

Dezagregarea celulelor microbiene prin procedee chimice cuprinde distrugerea componentelor lipoproteice ale membranei celulare prin acţiunea detergenţilor cationici sau anionici sau a solvenţilor organici, determinând trecerea în faza lichidă a unora dintre componentele biologic active.

Dezagregarea celulelor microbiene poate fi efectuată şi prin tratarea acestora cu diferite preparate enzimatice. Astfel, liza celulelor bacteriene poate fi indusă prin atacul enzimatic specific al legăturilor α-1,4 dintre moleculele de N-acetilglucozamină şi acidul N-acetilmuramic.

Dezintegrarea biologică enzimatică este una dintre cele mai vechi metode de obţinere a omogenatelor celulare. Astfel, este bine cunoscută descompunerea autolitică a drojdiei de bere uscată la 30°C, timp de 2–3 zile. Dezintegrarea microorganismelor de *Micrococcus lysodeikticus* poate fi realizată cu suc pancreatic, iar a ţesutului muscular cu enzime proteolitice izolate din *Bacillus subtilis*. Dezintegrarea biologică a *E.coli* poate fi realizată cu bacteriofagi.

7.3. CONCENTRAREA MEDIILOR DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

Mediile de biosinteză se concentrează prin operaţii specifice industriei chimice, cu deosebirea că este necesară protejarea lichidelor biologice datorită permeabilităţii acestora. Se utilizează adeseori evaporarea în vacuum, care permite efectuarea operaţiei la temperaturi relativ scăzute (25...50°C).

În ultimul timp se practică cu succes procedeele de concentrare atermică, ultrafiltrarea şi osmoza inversă.

Ultrafiltrarea reprezintă procesul de separare a componentelor unei soluţii datorită diferenţelor de volum molecular cu ajutorul unei membrane. Ultrafiltrarea este un procedeu de separare şi purificare a substanţelor biologic active, având următoarele avantaje:

– permite efectuarea concentrării la temperaturi scăzute, micşorând fenomenele de autodigerare şi pierderile în activitate prin denaturarea termică;
– nu necesită modificări de fază (evaporări, condensări);
– nu utilizează substanţe chimice;
– permite purificarea soluţiilor biologic active prin îndepărtarea unor componente cu volum molecular inferior.

Cercetările privind introducerea proceselor cu membrane urmăresc, în general, stabilirea posibilităţilor de utilizare eficientă a unor tipuri de membrane la concentrarea şi purificarea produselor biologic active, în cadrul elaborării tehnologiilor de obţinere a acestora.

Literatura de specialitate în acest domeniu cuprinde studii ample privind teoria proceselor de ultrafiltrare.

În centrul atenţiei cercetătorilor stau două fenomene ce ţin să limiteze performanţele utilizării membranelor în tehnicile de purificare:

– blocarea membranelor ("membrane fouling") prin adsorbţie de solut, în special proteine;
– polarizarea de concentraţie (gel polarizare).

Bazele teoretice ale explicării fenomenului de blocare a membranelor de ultrafiltrare datorită proteinelor au fost puse de Turker şi Hubble. Ei menţionează, în cazul fluxului transmembranar nul, un nivel al proteinelor asociate de membrană corespunzător unei izoterme de saturaţie cu un maxim la 207 $\mu g/cm^3$; în condiţiile fluxului prin membrană, această concentraţie creşte până la o nouă valoare limită, independentă de flux, dar depinzând de circulaţia tangenţială a fluidului supus separării. Rezistenţa stratului de proteină adsorbit creşte cu fluxul, grosimea depăşeşte monostratul şi adsorbţia prezintă un caracter reversibil cu regimul hidrodinamic. Referitor la modelul gel-polarizării, s-au stabilit relaţii între fluxul de permeat şi timp precum şi parametrii ce depind de condiţiile de operare (concentraţia macrosolutului, diferenţa de presiune aplicată, coeficientul de permeabilitate) şi de presiunea osmotică, difuzivitate.

Dintre aplicaţiile ultrafiltrării, cele din domeniul biotehnologiei ocupă un loc major, metoda fiind utilizată ades la concentrarea şi purificarea enzimelor de origine microbiană.

Firma DDS-Danemarca menţionează procese industriale de concentrare şi purificare prin ultrafiltrare a enzimelor, aplicate la nivelul anului 1987, în peste 80 de ţări.

În procesul de izolare şi purificare a enzimelor, una din etape o constituie demineralizarea soluţiei enzimatice. Această operaţie are loc în paralel cu concentrarea prin ultrafiltrare întrucât ionii anorganici având volum mic trec prin membrana de ultrafiltrare. Din această cauză, aplicarea metodei de concentrare prin ultrafiltrare a soluţiilor enzimatice conduce la eliminarea operaţiei de dializă, efectuată în mod obişnuit într-un flux de purificare.

7.4. USCAREA PRIN ATOMIZARE A MEDIILOR DE FERMENTAŢIE CU ACTIVITATE ENZIMATICĂ

Uscarea prin pulverizare se foloseşte pentru materialele care în faza iniţială sunt lichide (soluţii, suspensii, paste subţiri). Acestea, în vederea uscării, sunt pulverizate în particule de dimensiuni mici. Prin pulverizare la dimensiuni mici se înţelege obţinerea unei suspensii de lichid constituită din particule de dimensiuni între 2 şi 200 μm.

Datorită dimensiunilor particulelor, operaţia a fost denumită şi atomizare; în uscătoarele cu pulverizare, uscarea are loc foarte repede, astfel încât, materialul nu are timp să se încălzească peste limita admisibilă şi temperatura lui este apropiată de temperatura de evaporare a lichidului.

Materialul uscat se obţine sub formă de pulbere şi nu este necesară o mărunţire ulterioară.

Metoda este aplicată, în general, în condiţionarea enzimelor de mare tonaj, utilizate în hrana animalelor ca aditivi furajeri (proteaze, amilaze, celulaze) şi se realizează prin atomizarea integrală a mediului de cultură fără o altă purificare.

PARTEA A DOUA

TIPURI DE PROCESE BIOTEHNOLOGICE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- **BIOPROCESE ANAEROBE**
- **BIOPROCESE AEROBE**

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8 BIOPROCESE ANAEROBE

Capacitatea de a creşte în condiţii *anaerobe* este limitată la procariote (bacterii); la eucariote creşterea anaerobă este un proces tranzitoriu (microorganisme facultativ anaerobe).

Energia pentru creşterea anaerobă a bacteriilor poate fi obţinută prin respiraţie anaerobă şi prin fermentaţie.

Microorganismele *facultativ anaerobe* au capacitatea de a creşte aerob utilizând oxigen sau anaerob utilizând compuşi organici (fermentaţie) ca acceptori finali ai electronilor produşi în cursul catabolismului; au o rată mai mică de degradare a glucidelor în aerobioză decât în anaerobioză.

Fermentaţia este un proces de catabolism care are loc în condiţii de anaerobioză şi în care energia este obţinută prin utilizarea unor compuşi organici, atât ca donori, cât şi ca acceptori de electroni. Microorganismele care produc fermentaţii sunt facultativ sau obligatoriu anaerobe. Microorganismele anaerobe mor în contact cu aerul (O_2). Cele facultativ anaerobe sunt heterotrofe (capabile de respiraţie în prezenţa O_2 şi produc fermentaţii în absenţa acestuia).

Gama substanţelor fermentescibile este foarte largă: poliglucide (celuloză, amidon, chitină), diglucide (zaharoză, lactoză, maltoză), hexoze (glucoză, fructoză, galactoză), pentoze, polialcooli (glicerol, manitol); în cazul bacteriilor: aminoacizi, acizi organici, purine, pirimidine.

Produşii fermentaţiilor sunt de asemenea foarte diferiţi:

- alcooli (etanol, propanol, butanol, 2,3-butandiol, glicerol);
- acizi (lactic, formic, acetic, propionic, butiric);
- esteri (etilacetat, etilbutiric, poli β-hidroxibutirat);
- diferite substanţe gazoase (H_2, CH_4, CO_2).

Drojdiile şi lactobacilii homofermentativi sunt implicaţi în fermentaţii pure, producând aproape exclusiv alcool, acid lactic şi numai urme din alţi produşi; alte bacterii metabolizează acidul piruvic mai departe, ducând la formarea unor produşi ca : acid butiric, alcool butilic, acetonă, acid propionic, izopropanol.

BCU BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

Exemple de respiraţii anaerobe (fermentaţii):

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$
Glucoză — Alcool etilic

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_3H_6O_3$
Glucoză — Acid lactic

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow C_3H_7COOH + 2CO_2 + 2H_2$
Glucoză — Acid butiric

În laborator, condiţiile de anaerobioză necesare fermentaţiilor se realizează prin însămânţarea în flacoane cu medii lichide, complet umplute, acoperite lax cu un dop.

În industrie, incubarea se face fără agitare, iar O_2 nu poate pătrunde în mediul din fermentator; oxigenul de la suprafaţa mediului este înlocuit cu dioxidul de carbon produs în timpul fermentaţiei care este mai greu. Multe fermentaţii anaerobe au o importanţă deosebită pentru că furnizează produşi cu valoare economică ridicată, ce pot fi obţinuţi pe scară industrială.

Tabelul 8.1

Bacterii fermentative capabile să se dezvolte în condiţii de anaerobioză

Microorganismul producător	Fermentaţia	Substartul fermentat	Produsul fermentaţiei
Lactobacillus casei	Lactică	Glucoză	Lactat
Leuconostoc mesenteroides	Lactică	Glucoză	Lactat
Bifidobacterium bifidum	Lactică	Glucoză	Acetat
Zymomonas mobilis	Alcoolică	Glucoză	Etanol
Escherichia coli	Acidă mixtă	Glucoză	Etanol, acetat, lactat
Enterobacter aerogenes	Butandiolică	Glucoză	Etanol, 2,3-butandiol
Clostridium aceticum	Homoacetică	Fructoză	Acetat
Clostridium butiricum	Butirică	Glucoză	Butirat
Clostridium kluyverii	Butirică	Etanol + acetat	Butirat
Clostridium acetobutylicum	Butirică	Glucoză	Butirat, butanol

8.1. FERMENTAŢIA ALCOOLICĂ

Fermentaţia alcoolică are numeroase aplicaţii practice în industrie la fabricarea: spirtului, băuturilor spirtoase, vinului, berii, sucurilor de fructe precum şi în panificaţie.

Etanolul se obține chimic, dar și prin fermentarea completă de către unele drojdii a diferitelor glucide, umată de distilarea alcoolică.

Drojdiile au un echipament enzimatic bogat, datorită căruia obțin în mediul anaerob energia necesară manifestărilor lor vitale, prin procesul de fermentație alcoolică a glucidelor, după reacția globală:

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2\ CH_3\text{-}CH_2OH + 2CO_2$$

În realitate, mersul reacției este mult mai complicat, formându-se și numeroși compuși secundari de fermentație.

Începutul fermentației corespunde perioadei de multiplicare a drojdiei, cu un consum al sursei de carbon de 2% și o degajare slabă de CO_2 (fermentație redusă). După 20 de ore, fermentația este însoțită de degajare intensă de dioxid de carbon, iar concentrația în sursă de carbon se reduce de la 85% la 15% din cea inițială (fermentația principală). Urmează o perioadă liniștită, cu degajare slabă de dioxid de carbon și concentrația sursei de carbon reziduală 2% (fermentația secunadară). Formarea etanolului se observă după mai multe zile, în funcție de temperatură.

Prin procesul de fermentare alcoolică rezultă o energie de doar 8,16 kcal, fapt confirmat și de randamentul energetic scăzut realizat într-o unitate de timp. Sunt necesare 12 molecule de glucoză pentru descompunerea în etanol în vederea obținerii aceleiași cantități de energie care ar rezulta prin respirația unei singure molecule de glucoză. Într-un proces mixt de descompunere a glucidelor pe cale anaerobă și aerobă, 98% din această cantitate se folosește pentru fermentare și 2% pentru respirație.

În biotehnologie se realizează fermentații dirijate, cu tulpini selecționate, care durează 20–24 de ore. Scopul acestor fermentații este obținerea de alcool etilic industrial cu randamente mari; se utilizează tulpini de *Sacharomyces cerevisiae* selecționate.

8.2. FERMENTAȚIA LACTICĂ. PROBIOTICE

Bacteriile producătoare de acid lactic au fost utilizate la prepararea și prelucrarea alimentelor din timpuri istorice. Bacteriile lactice sunt implicate în obținerea alimentelor fermentate din materii prime agricole, cum sunt: laptele, carnea și produsele vegetale, care dețin o pondere importantă în industria alimentară. Tulpinile de bacterii lactice folosite pentru obținerea produselor alimentare sunt izolate și selectate numai după numeroase testări.

În ultimii ani, bacteriile lactice au fost folosite și ca produse de tip probiotic. Probioticele sunt microorganisme care, după o administrare orală, sunt capabile să colonizeze tractul digestiv și să păstreze sau să determine o creștere a

florei naturale digestive, prevenind aderarea microorganismelor patogene la peretele intestinului şi asigurând securitatea utilizării optime a hranei. Unele tulpini de bacterii lactice inhibă proliferarea bacteriilor patogene prin producerea de acizi organici şi prin scăderea *p*H-ului. De asemenea, unele bacterii lactice produc peroxidul de hidrogen şi previn aderarea bacteriilor patogene la peretele intestinului. Datorită acestor proprietăţi, bacteriile lactice pot fi folosite ca probiotice.

Prin enzimele proprii, probioticele măresc utilizarea digestivă a hranei precum şi procesele de detoxifiere. Astfel, probioticele produc cantităţi mari de β-galactozidază, contribuind la ameliorarea digestiei lactozei. Cu ajutorul bacteriilor lactice se reduce nivelul fenolului şi al indolului, substanţe ce se acumulează ca rezultat al dezechilibrării florei intestinale.

Probioticele stimulează activarea sistemului imunologic acţionând ca barieră de protecţie a tubului digestiv. Pot fi folosite în combaterea diferitelor forme de cancer, atât pe calea activării sistemului imunitar cât şi prin inhibarea unor enzime implicate în carcinogeneza intestinală.

Unele tulpini de bacterii lactice au capacitatea de a cataboliza colesterolul şi, ca urmare, aceste tulpini bacteriene au activitate hipocolesterolemiantă.

Lactobacilii sunt folosiţi pentru prevenirea infecţiilor urogenitale datorită proprietăţii acestor tulpini bacteriene de a intra în competiţie cu microorganismele patogene în ceea ce priveşte aderenţa la epiteliul urogenital.

Datorită acestor proprietăţi, a utilizării lor cu uşurinţă în laborator, a faptului că cele mai importante proprietăţi metabolice sunt codificate de gene plasmidiale, bacteriile lactice constituie un material propice pentru ameliorare.

8.2.1. Microorganisme care produc fermentaţia lactică

Grupul de bacterii lactice este, în general, puţin definit, fără a se preciza înrudirile. S-a acceptat că toţi membrii grupului de bacterii lactice au drept caracteristică producerea de acid lactic din hexoze. Pe baza produşilor finali ai metabolizării glucozei, bacteriile lactice care produc acid lactic ca unic produs major se numesc homofermentative, iar cele care produc cantităţi egale de acid lactic, etanol, CO_2 se numesc heterofermentative. Numai microorganismele homofermentative prezintă importanţă pentru producţia de acid lactic. *Streptococcus cremoris* şi *Streptococcus lactis* sunt cele mai importante bacterii lactice folosite în industrie. Speciile preferate din punct de vedere comercial pentru producţia de acid lactic aparţin grupului *Lactobacillus.*

Caracteristicile bacteriilor lactice din genurile *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus* sunt următoarele: sunt homofermentative; temperatura optimă de creştere ≥ 40°C; *p*H-ul optim este între 5 şi 7; sunt facultativ anaerobe, randamentul

producției de acid lactic din glucoza fiind >90 % (g/g); pot produce acid lactic în concentrație >3 %; pot produce unul sau ambii izomeri; sunt slab proteolitice sau lipolitice, cu capacități sintetice foarte limitate, necesitând prezența în mediu a vitaminelor din complexul B, aminoacizilor, bazelor purinice și pirimidinice.

În cazul lactobacililor, deși majoritatea sunt aerotoleranți sau microaerofili, în condiții anaerobe se obține o creștere optimă a acestora. Deși *Lactobacilii* nu posedă citocromi, catalază și dismutază, totuși majoritatea au flavin oxidaze și peroxidaze care oxidează NADH folosind oxigenul ca acceptor final de electroni. Astfel, *Lactobacillus plantarum* produce mai multă biomasă la o viteză scăzută de transfer a oxigenului decât în condiții de strictă anaerobioză. Unii lactobacili necesită prezența manganului drept cofactor în sistemele enzimatice ca, de exemplu, pentru lactatdehidrogenază (LDH), ARN-polimerază și manganocatalază.

Prescott și Dunn au studiat producția de acid lactic la fungi. Soccol și colaboratorii au studiat 19 specii de *Rhizopus*. Numai patru produc L(+) acid lactic la *p*H = 6 în condiții aerobe. Au fost studiați factorii de control pentru producerea de acid lactic în cazul unor tulpini de *Lactobacillus delbrueckii* NCIB 8130, în condiții improprii de creștere. Aceste specii de *Lactobacillus* sunt folosite pentru producerea comercială de acid lactic prin fermentație. Multe microorganisme din grupul bacteriilor lactice folosite în industria alimentară produc metaboliți antimicrobieni care pot fi folosiți pentru conservarea hranei.

Creșterea rolului comercial al bacteriilor lactice pentru producerea de hrană fermentată a trezit interesul pentru proprietățile biochimice și microbiologice incluzând și proprietățile genetice.

8.2.2. Căile metabolice la bacteriiie lactice

Bacteriile lactice reprezentate prin genurile: *Streptococcus* (Sc), *Enterococcus* (Ec), Lactococcus (Lc), *Lactobacillus (Lb), Leuconostoc (Ln), Pediococcus (Pc)* și *Bifidobacterium(Bf)* folosesc una din următoarele căi fermentative:

- calea homofermentativă [calea Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)];
- calea heterofermentativă [calea pentozo-fosfocetolazei (PPC)];
- calea bifidobacteriilor [calea fructozo 6-fosfocetolazei] .

În funcție de natura și concentrația produșilor rezultați în urma fermentației glucozei, bacteriile lactice se împart în două grupe: homofermentative și heterofermentative.

Bacteriile lactice homofermentative. Acestă grupă cuprinde unele specii de streptococi (*Sc. mutans, Sc. termophilus),* enterococi (*Ec. faecalis*), lactococi (*Lc. lactis ssp. lactis*), pediococi (*Pc. pentosaceus, Pc. halophilus*) și lactobacilli (*Lc. casei., L. plantarum*). Aceste bacterii convertesc aproape toată cantitatea de glucoză în acid lactic (90–95%). În cazul bacteriilor lactice homofermentative,

glucoza este transportată şi fosforilată prin intermediul sistemului PT-PEP specific glucozei (manozei) rezultând glucozo-6-P care prin calea EMP este transformată în acid lactic. Fructozo-1,6-difosfat aldolaza este prezentă la toate speciile homofermentative şi este indispensabilă pentru funcţionarea căii EMP. Fructozo difosfat aldolaza catalizează reacţia prin care fructozo-1,6-difosfat este scindat în două fragmente, fiecare fragment având câte trei atomi de carbon: dihidroxiacetonfosfat (DHAP) şi gliceraldehid 3-fosfat (GA3P). Bacteriile homolactice conţin în mod obişnuit concentraţii mari de fructozo difosfat (15–30 mM) importante pentru reglare, servind la activarea enzimelor care catalizează ultimele reacţii ale căii glicolitice, adică piruvat kinaza şi lactat dehidrogenaza.

Gena codificatoare pentru L(+) lactat dehidrogenază a fost clonată pentru mai multe specii de bacterii lactice. A fost clonată pentru *Lb. plantarum* (Taguchi şi Ohta, 1991), *Lb. casei* (Hensel şi colab., 1983; Kim şi colab., 1991), *Lc. lactis* (Danos şi colab., 1992) şi *Sc. mutans* (Duncan şi Hillman, 1991).După elucidarea secvenţei de aminoacizi s-au putut identifica situsurile de legare ale fructozo difosfat şi substratului. S-a demonstrat că toate secvenţele conţin un triplet de glicina [GXGXXG] care explică plierea βαβ şi domeniul de legare a cofactorului pentru numeroase enzime dependente de NAD^+ (Thompson şi Donkersloot, 1992). Secvenţele de aminoacizi pentru D(-) lactat dihidrogenaza NAD^+ dependentă, fructozo difosfat independentă provenind de la *Lb. bulgaricus* si *Lb. plantarum* au fost descrise relativ recent de Kockhar şi colab. (1992) şi de Tagudu şi Ohta (1991).

În afară de glucoză, bacteriile lactice homofermentative au capacitatea de a fermenta diferite monozaharide, dizaharide şi ocazional hexitoli. Cu excepţia galactozo-1-P şi fructozo-1-P, toate glucidele şi hexitolii fosforilaţi intră în ciclul glicolitic la nivelul glocozo-6-P sau fructozo-6-P. Câteva glucide, cum ar fi lactoza şi zaharoza, sunt metabolizate ca şi glucoza prin fermentaţie homolactică.

Când lactoza este folosită ca sursă de carbon şi este preluată din mediu de un sistem permeazic ATP-dependent (majoritatea lactobacililor şi *Sc.Termophilus*) este convertită iniţial în glucoză şi galactoză cu ajutorul β-galactozidazei sau când lactoza este preluată din mediu prin acţiunea sistemului PEP-PTS (fosfoenol-piruvat-sistem fosfotransferazic); este hidrolizat la glucoză şi galactozo-6-P prin acţiunea fosfo β-galactozidazei.

Alte surse de energie, cum ar fi galactoza, sorbitolul, manitolul etc., pot produce în timpul fermentaţiei lor şi diferite cantităţi de acetat, formiat, acetona, 2,3-butandiol, pe lângă acidul lactic. Pentru unele tulpini de *Lc. lactis*, o parte din acidul piruvic format prin glicoliză poate fi eliminat prin sistem NADPH-dependent, care este activat de L-ornitină sau L-lizină.

Prin calea EMP sunt produşi 2 moli de ATP şi 2 moli de acid lactic pornind de la 1 mol de glucoză metabolizată (fig. 8.1, *a*).

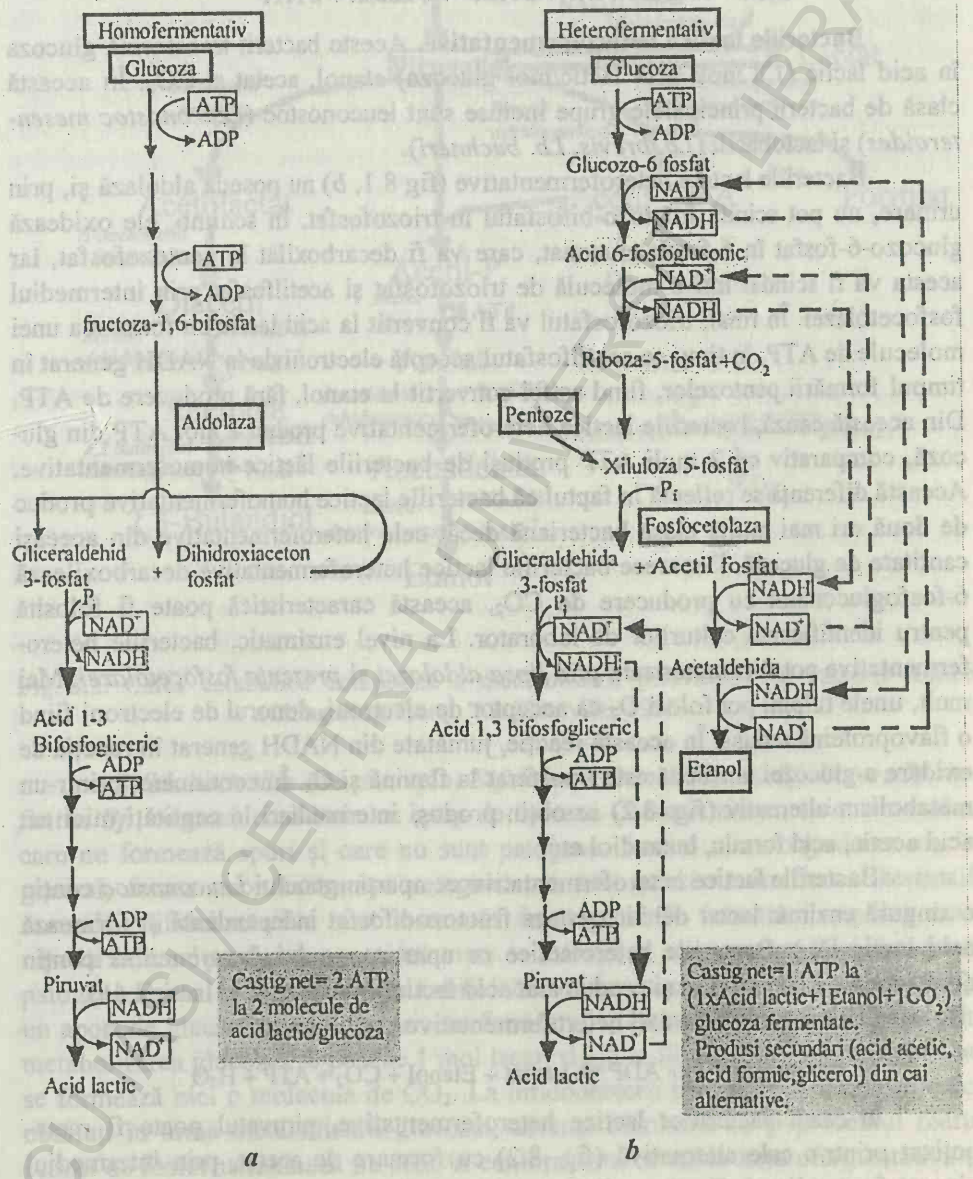


Fig.8.1. Fermentaţia glucozei de către bacteriile lactice homofermentative şi heterofermentative.

Observaţie: nu se formează ATP la speciile care conduc la formarea etanolului.

Ecuaţia generală a căii homofermentative este următoarea:

$$\text{Glucoza} + 2\,P + 2\,ADP \rightarrow 2\,\text{Lactat} + 2\,ATP$$

Bacteriile lactice heterofermentative. Aceste bacterii transformă glucoza în acid lactic (1,8 moli acid lactic/mol glucoza) etanol, acetat şi CO_2. În această clasă de bacterii principalele grupe incluse sunt leuconostoc (*Leuconostoc mesenteroides*) şi lactobacili (*Lb. brevis*, *Lb. buchneri*).

Bacteriile lactice heterofermentative (fig 8.1, *b*) nu posedă aldolază şi, prin urmare, nu pot scinda fructozo-bifosfatul în triozofosfat. În schimb, ele oxidează glucozo-6-fosfat în 6-fosfo gluconat, care va fi decarboxilat la pentozofosfat, iar acesta va fi scindat într-o moleculă de triozofosfat şi acetilfosfat prin intermediul fosfocetolazei. În final, triozofosfatul va fi convertit la acid lactic cu formarea unei molecule de ATP, în timp ce acetilfosfatul acceptă electroni de la NADH generat în timpul formării pentozelor, fiind astfel convertit la etanol, fără producere de ATP. Din această cauză, bacteriile lactice heterofermentative produc 1 mol ATP din glucoză, comparativ cu 2 moli ATP produşi de bacteriile lactice homofermentative. Această diferenţă se reflectă în faptul că bacteriile lactice homofermentative produc de două ori mai multă masă bacteriană decât cele heterofermentative din aceeaşi cantitate de glucoză. Deoarece bacteriile lactice heterofermentative decarboxilează 6-fosfogluconatul cu producere de CO_2, această caracteristică poate fi folosită pentru identificarea culturilor de laborator. La nivel enzimatic, bacteriile heterofermentative pot fi caracterizate prin *lipsa aldolazei* şi *prezenţa fosfocetolazei*. Mai mult, unele tulpini pot folosi O_2 ca acceptor de electroni, donorul de electroni fiind o flavoproteină redusă. În această reacţie, jumătate din NADH generat în reacţia de oxidare a glucozei la riboză este transferat la flavină şi O_2. În continuare, printr-un metabolism alternativ (fig. 8.2) se obţin produşi intermediari în cantităţi mici ca: acid acetic, acid formic, butandiol etc.

Bacteriile lactice heterofermentative ce aparţin genului *Leuconostoc* conţin o singură enzimă: lactat dehidrogenaza fructozodifosfat independentă şi formează acid lactic D(-). Bacteriile heterolactice ce aparţin genului *Lactobacillus* conţin două enzime LDH diferite şi produc atât acid lactic D(-) cât şi acid lactic L(+).

Ecuaţia generală a căii heterofermentative este următoarea:

$$\text{Glucoză} + P_i + ADP \rightarrow \text{Lactat} + \text{Etanol} + CO_2 + ATP + H_2O$$

În cazul bacteriilor lactice heterofermentative, piruvatul poate fi metabolizat printr-o cale alternativă (fig. 8.2) cu formare de acetat, prin intermediul piruvat format liazei. Dacă acetil-CoA este redusă la acetaldehidă şi se formează etanol concomitent cu regenerarea NAD^+. Piruvat format liaza este extrem de sensibilă la oxigen şi este inhibată atât de gliceraldehid 3- fosfat cât şi de dihidroxiaceton fosfat.

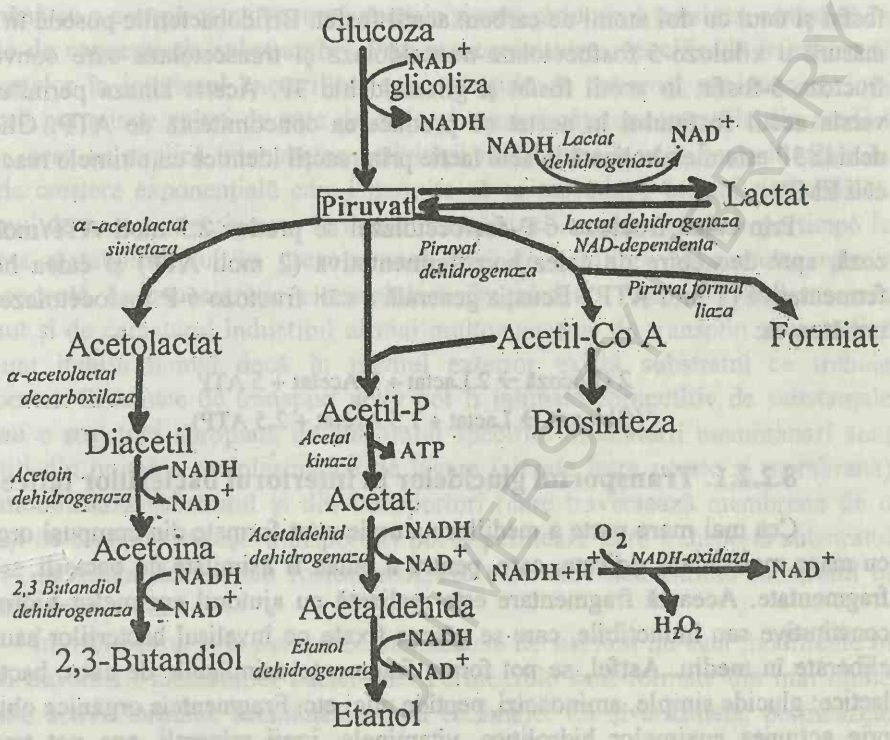


Fig. 8.2. Calea catabolică compozită a metabolizării piruvatului la bacterii lactice (Ching Ping Tseng, T.J. Montville, 1993).

Bifidobacteriile (de exemplu, *Bifidobacterium bifidum*, *Bf. breve*, *Bf. infantis*, *Bf. longum*) constituie un grup de bacterii Gram-pozitive, strict anaerobe, care nu formează spori şi care nu sunt patogene. Aceste microorganisme au, în general, forma unor bastonaşe neregulate şi sunt prezente în flora intestinală normală. Bifidobacteriile sunt în număr foarte mare în intestinul copiilor nounăscuţi la care produc o rezistenţă mare la infecţii şi se opun apariţiei de agenţi patogeni. Pentru o creştere optimă, bifidobacteriile necesită un mediu complex şi un aport de glucide care să favorizeze fermentaţia. În cazul bifidobacteriilor, prin metabolizarea glucozei se produc 1 mol lactat şi 1,5 moli acetat. În acest proces nu se formează nici o molecula de CO_2. La bifidobacterii proporţia de acizi organici obtinuţi în urma metabolizării glucozei, absenţa aldolazei ca şi procentul foarte scazut de fosfofructokinază nu sunt în conformitate cu calea heterofermentativă şi nici cu cea homofermentativă. În cazul bifidobacteriilor există o altă cale fermentativă a glucidelor. Enzima cheie a acestei căi fermentative este fructozo-6-fosfat fosfocetolaza care, în prezenţa P_i, catalizează reacţia prin care, pornind de la fructozo-6-P, se obţin două fragmente, unul cu 4 atomi de carbon: D-eritrulozo-4-

fosfat şi unul cu doi atomi de carbon: acetil fosfat. Bifidobacteriile posedă în egală măsură o xilulozo-5-fosfocetolaza-transaldolaza şi transcetolaza care convertesc fructozo-6-fosfat în acetil fosfat şi gliceraldehid 3P. Acetat kinaza permite conversia acetil fosfatului în acetat cu producerea concomitentă de ATP. Gliceraldehida 3P este metabolizată în acid lactic prin reacţii identice cu ultimele reacţii ale căii EMP.

Prin calea fructozo 6-P–fosfocetolazei se produc 2,5 moli ATP/mol glucoză, spre deosebire de calea homofermentativa (2 moli ATP) şi calea heterofermentativa (1 mol ATP). Ecuaţia generală a căii fructozo-6-P fosfocetolazei este următoarea:

2 Glucoză → 2 Lactat + 3 Acetat + 5 ATP

(Glucoză → Lactat + 1,5 Acetat + 2,5 ATP).

8.2.2.1. Transportul glucidelor în interiorul bacteriilor latice

Cea mai mare parte a mediilor naturale sunt formate din compuşi organici cu mase moleculare ridicate, care, pentru a putea fi asimilate de bacterii, trebuie fragmentate. Această fragmentare este realizată cu ajutorul enzimelor hidrolitice constitutive sau inductibile, care se găsesc fixate pe învelişul bacteriilor sau sunt eliberate în mediu. Astfel, se pot forma fragmente asimilabile de către bacteriile lactice: glucide simple, aminoacizi, peptide mici etc. Fragmentele organice obţinute prin acţiunea enzimelor hidrolitice, vitaminele, ionii minerali, apa pot traversa membrana prin transport activ sau pasiv şi pot ajunge în interiorul bacteriilor lactice. Unele substraturi nu comportă decât un singur sistem de transport în timp ce altele pătrund în bacterii prin diferite căi.

Transportul pasiv. Este independent de metabolism, fiind rezultatul unui gradient de concentraţie a fiecărei substanţe şi nu implică nici un consum energetic. Transportul pasiv cuprinde difuzia liberă şi difuzia facilitată. Difuzia liberă este mecanismul prin care membrana citoplasmatică este traversată datorită mişcărilor moleculelor unui substat (substrat sau factor de creştere), membrana comportându-se ca o membrană osmotică inertă. Fluxul moleculelor depinde de concentraţia lor în mediu: moleculele se deplasează din mediu cu concentraţie mai mare spre mediu cu concentraţie mai mică, până se ajunge la starea de echilibru, deplasarea moleculelor realizându-se în funcţie de mediu şi de temperatură. Prin difuzie liberă ajung în bacterie substanţe liposolubile, substanţe gazoase şi molecule neutre având dimensiuni mici.

În cazul *difuziei facilitate*, transportul moleculelor din mediul extern se realizează prin intermediul unui mediator mobil care efectuează naveta între cele două feţe ale membranei. Prin acest mod de difuzie, concentraţia intracelulară a substanţei transportate nu depăşeşte concentraţia extracelulară.

Transportul activ. Este strict dependent de metabolismul celular şi poate continua atâta timp cât celula este capabilă să mobilizeze rezervele metabolice. Acest transport se face împotriva unui gradient de concentraţie şi, ca urmare, se

aseamănă cu o pompă care consumă energie şi care produce o presiune osmotică în funcţie de concentraţia substratului. Prin acest mecanism specific de transport al substanţelor în interiorul bacteriilor, concentraţiile de zaharuri, aminoacizi, ioni minerali pot atinge valori de sute de ori mai mari decât concentraţiile din mediul extern, ceea ce explică intensitatea activităţii metabolice a unei bacterii aflate în faza de creştere exponenţială care-i permite să se reproducă într-un ritm ridicat. Sistemul de transport activ este format din mediatori membranari care participă la reglarea metabolismului în preznţa unei stări de echilibru intracelular relativ independentă de concentraţia extracelulară de substrat. Acest rol reglator este susţinut şi de caracterul inductibil al mai multor sisteme de transport activ, adică ele sunt induse numai dacă în mediul exterior există substratul ce trebuie transportat. Sistemele de transport activ pot fi inhibate competitiv de substanţele care au o structură apropiată de substratul specific. Mediatorii membranari sunt alcătuiţi din proteine periplasmatice de legare (situate între perete şi membrană) care mobilizează substratul şi din transportori (care traversează membrana de o parte şi de cealaltă). Aceşti transportori pot fi permeaze care transportă substratul fără a-l modifica chimic sau fosfotransferaze care modifică chimic substratul în timp ce-l transportă.

În *transportul prin permeaze*, moleculele de substrat nu sunt modificate în timpul traversării membranei bacteriene. Permeazele sunt formate din mai multe proteine active înrudite, asemănătoare cu enzimele. Ca şi enzimele, permeazele sunt stereospecifice, inductibile şi se supun inhibiţiei competitive. Forţa electromotrice de pompare este produsă, pe de o parte, prin energia chimică degajată prin hidroliza ATP în ADP şi P_i (sub acţiunea unei ATP-aze care are o afinitate crescută pentru substratul specific de transportat) şi, pe de altă parte, prin combinarea unui potenţial electric membranar şi a unui gradient chimic de protoni la traversarea membranei. Numeroase permeaze care intervin în transportul activ al glucidelor, aminoacizilor, peptidelor, citratului etc. au fost evidenţiate la bacteriile lactice.

În cazul transportului prin fosfotransferaze, moleculele de substrat suferă o modificare chimică şi se acumulează sub această formă transformată în citoplasmă. În acest sistem, transportul substanţelor este catalizat de un grup de enzime care utilizează fosfoenol piruvatul ca o sursă de energie. Acest sistem intervine în transportul glucidelor care necesită trei reacţii în cazul transportului activ, de exemplu transportul lactozei la bacteriile lactice (fig 8.3):

$$\text{PEP} + \text{HPr} \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{EI}} \text{Piruvat} + \text{P-HPr}$$

În această reacţie, fosfoenol piruvatul (PEP) prezent în citoplasmă donează fosfatul unei proteine membranare (HPr) lipsită de specificitate pentru lactoză, proteină care este fosforilată în fosfo-HPr (P-HPr). Reacţia este catalizată de o enzimă citoplasmatică (EI) nespecifică pentru lactoză.

$$2P - HPr + E\,III^{lac} \longrightarrow 2\,HPr + E\,III^{lac}\text{-}2P$$

unde $E\,III^{lac}$ este o enzimă citoplasmatică, solubilă şi specifică pentru lactoză.

$$E\,III^{lac}\text{-}2P + 2\,\text{Lactoză} \xrightarrow[Mg^{2+}]{E\,II^{lac}} E\,III^{lac} + 2\,\text{Lactoză} - P$$

unde $E\,II^{lac}$ este o enzimă membranară şi specifică pentru lactoză.

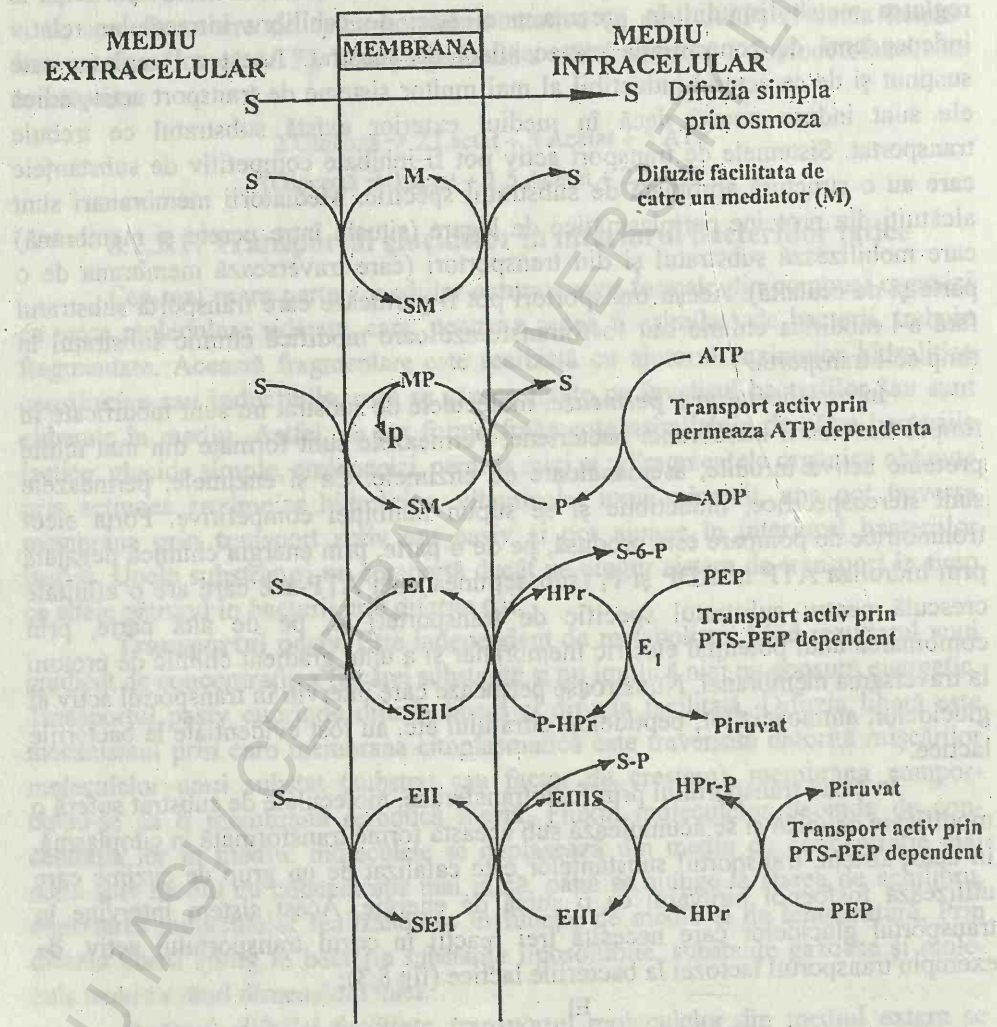


Fig. 8.3. Principalele sisteme de transport ale substraturilor prin membrana celulară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Enzimele E II^{lac} şi E III^{lac} sunt inductibile în prezenţa lactozei şi galactozei.

Fiecare moleculă de lactoză fosforilată este degradată în citoplasmă prin diferite căi în conformitate cu caracteristicile speciei bacteriene şi condiţiile de mediu. Existenţa sistemului fosfotransferazei PEP dependente (PTP-PEP dependent) a fost demonstrată în cazul transportului activ al zaharurilor. S-a demonstratat că enzimele El şi proteina HPr există la toate sistemele fosfotransferazei.

8.2.2.2. Bioenergetica la bacteriile lactice

În general, energia metabolică a lactobacteriilor este furnizată prin fosforilarea unui substrat (glucide) şi prin fluxul de produşi finali eliminaţi prin cotransport cu protoni. În timpul creşterii în prezenţa glucidelor asimilabile, bacteriile lactice menţin o forţă protonmotrice (*fpm*) ridicată şi un potenţial al fosfatului bogat în energie (ATP şi PEP). Când furnizarea de energii încetează, intermediarii energetici se consumă rapid, apoi, la începutul privării de nutrienţi, fondul intern de PEP creşte rapid. Acest lucru favorizează capacitatea microorganismului de a acumula într-o anumită perioadă de timp o sursă de energie, utilizând un sistem PEP dependent. La bacteriile lactice în generarea de energie metabolică intervin două procese esenţiale: pe de o parte procesul legat de fosforilarea substratului şi, pe de altă parte, procesul ce rezultă din fenomenele chimiosmotice generatoare de forţă protonmotrice. În procesul legat de fosforilarea substratului, energia eliberată prin reacţiile de dehidrogenare (oxidare) sau prin acţiunea liazelor este folosită pentru sinteza de ATP. În degradarea zaharurilor, procesul de fosforilare intervine la două niveluri. În condiţii de anaerobioză lactobacteriile produc doi moli de lactat pentru un mol de hexoză. În condiţii de aerobioză un rol important îl are NADH oxidaza care catalizează reacţii prin care oxigenul molecular acceptă protoni. Oxigenul molecular poate accepta şi protoni proveniţi de la piruvat, dar în acest caz reacţia este catalizată de altă enzimă şi anume piruvat oxidaza, rezultând CO_2, H_2O şi acetilfosfat. Prin conversia acetilfostatului în acetat rezultă surplus de molecule de ATP (fig.8.4).

Al doilea mecanism generator de energie este reprezentat de pompele de protoni care transportă ionii de hidrogen din citoplasmă către mediul extern. Conform teoriei chimiosmotice a lui Mitchell, acest transport rezultă din generarea în membrană a unui potenţial electric $\Delta\psi$ (de sarcină negativă în interiorul celulei) şi un gradient chimic de protoni ($-z\Delta pH$) de-a lungul membranei (*p*H alcalin în interiorul celulei). Suma acestor două forţe este forţa proton-motrice ($fpm = \Delta p = \Delta\psi - z\Delta pH$). Această forţă proton-motrice activează ATP-aza membranară (stimulată şi de ioni de Ca^{2+} şi Mg^{2+}). ATP-aza membranară funcţionează reversibil. Energia gradientului electrochimic este convertită în energie chimică sub forma sintezei de ATP sau gradienţilor ionici. Crearea şi menţinerea unei forţe proton-

motrice prin hidroliza ATP a condus la consum mare de ATP şi, ca urmare, bacteriile lactice, pentru a limita pierderea de energie, au dezvoltat o reglare a fluxului de ioni lactat într-un sistem simport cu doi protoni. Deoarece efluxul de lactat este continuu, o forţă proton-motrice e produsă continuu.

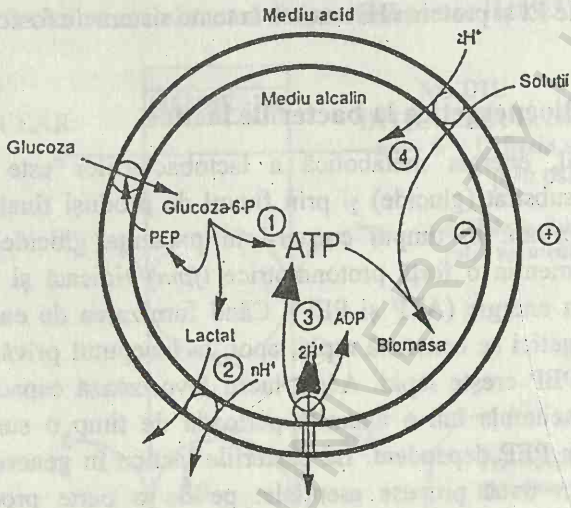


Fig. 8.4. Schemele proceselor generatoare şi consumatoare de energie în timpul metabolismului la lactobacterii:

1 – sinteza de ATP prin glicoliză; *2* – cuplarea efluxului de protoni cu efluxul de ioni lactat; *3* – cuplarea efluxului de protoni cu consumul de ATP sau a influxului de protoni cu producerea de DATP; *4* – cuplarea influxului de protoni cu influxul de soluţie.

S-au efectuat experienţe în care s-au analizat consecinţele modificărilor mediului asupra contribuţiei efluxului de lactat, la energia metabolică. Astfel de experienţe au fost realizate pe *Lc. lactis* ssp. *cremoris* în culturi discontinue şi s-au studiat: forţa proton-motrice şi gradientul de lactat în timpul creşterii bacteriilor. Raportul gradient de concentraţie de lactat/forţă proton-motrice se micşorează în timpul creşterii bacteriei şi, ca urmare, scade contribuţia efluxului de lactat la energia metabolică. S-a constatat că *p*H-ul se micşorează brusc la sfârşitul fazei de creştere exponentială, dar organismul în creştere menţine *p*H-ul său intern la o valoare constantă de 6,6, care determină formarea unui gradient de *p*H. Scăderea *p*H-ului determină dispariţia gradientului de *p*H, diminuarea activităţii enzimelor până la dispariţie, ceea ce produce o scădere a potenţialului electric şi a forţei proton-motrice o dată cu încetarea metabolismului.

Al doilea mecanism de producere a forţei proton-motrice la lactobacterii este excluderea de protoni provocată de transferul H^+/lactat. În acest caz, forţa motrice este produsă prin efluxul de acid lactic (care este produsul final al

fermentației). Microorganismele pot utiliza o parte din energia metabolică produsă prin glicoliză, energie care s-ar pierde.

8.2.2.3. Comportamentul bacteriilor lactice în prezența oxigenului

Bacteriile lactice pot fi facultativ anaerobe, microaerofile sau relativ aerotolerante. În realitate, nici unul dintre aceste calificative nu se potrivesc perfect, deoarece, în funcție de substrat și de condițiile de cultură, o tulpină particulară a grupului de bacterii lactice poate fi anaerob facultativă, microaerofilă sau aerotolerantă.

Producerea energiei în aerobioză. Producerea energiei în cursul unui metabolism aerob este mult mai mare decât în cursul unui metabolism anaerob. De exemplu, metabolismul glucozei se produce astfel:

– în aerobioză:

$$C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 \longrightarrow 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 675 \text{ kcal}$$

– în anaerobioză:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,C_2H_5OH + 30 \text{ kcal}$$
(Etanol)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,C_2H_6O_3 + 25 \text{ kcal}$$
(Acid lactic)

Cantitatea de energie necesară pentru a asigura nevoile vitale ale unei bacterii fiind constantă, oricare ar fi condițiie de aerare din mediu, se poate trage concluzia că în aerobioză o bacterie consumă o cantitate de glucide mai mică decât în anaerobioză. O creștere a randamentului de biomasă în aerobioză a fost observată, în special, atunci când concentrația de zaharuri este mică și în cazul speciilor *Ec. faecalis* și *Lb. plantarum*.

Producerea de peroxid de hidrogen. Anumite bacterii lactice consumă oxigenul solubil din mediul de cultură, în măsura în care acesta conține un substrat oxidabil. Reacția de oxidoreducere, care duce la producerea peroxidului de hidrogen, recurge la transferul a doi electroni către o moleculă de oxigen astfel:

$$O_2 + 2\,e^{--} + 2\,H^+ \rightarrow H_2O_2$$

Enzimele implicate în reacție sunt următoarele :

– *piridin-nucleotid oxidaza-redusă.* Toate bacteriile lactice par să aibă proprietatea comună de a avea: NADH-oxidaza. Există trei tipuri de NADH-oxidază: primele două sunt flavoproteine non-hemice, din care una catalizează reducerea oxigenului în H_2O_2, și cealaltă catalizează reducerea oxigenului în apă. Enzima NADH: H_2O_2 oxidaza a fost pentru prima dată descrisă la *Ec. faecalis* și de atunci prezența a fost confirmată la numeroase bacterii lactice. Enzima de origine citoplasmatică este instabilă și nu a fost purificată:

$$NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{NADH: } H_2O_2 \text{ oxidaza}} NAD^+ + H_2O_2$$

$$2\,NADH + 2\,H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{NADH: } H_2O_2 \text{ oxidaza}} 2\,NAD^+ + 2\,H_2O_2$$

– ***piruvat oxidaza***, care catalizează reacţia directă a piruvatului cu oxigenul molecular şi a fost descoperită pentru prima dată la *Lb.delbrueckii* precum şi la alte câteva specii de lactobacili:

$$Piruvat + Fosfat + O_2 \xrightarrow[TPP,\,FAD]{\text{Piruvat oxidaza}} Acetilfosfat + CO_2 + H_2O_2$$

– ***α-glicerofosfat oxidaza.*** Reacţia catalizată de α-glicerofosfat oxidază se întâlneşte la bacteriile lactice care utilizează glicerolul ca substrat dependent de oxigen pentru creşterea lor. Ea se întâlneşte şi la speciile din genurile *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*. Enzima care a fost parţial purificată este de natură citoptasmatică şi conţine FAD. Aceste oxidaze diferite sunt, în principal, responsabile de producerea H_2O_2 la bacteriile lactice:

$$\alpha\text{-Glicerofosfat} + O_2 \xrightarrow{\alpha\text{-Glicerofosfat oxidaza}} \text{Dihidroxiaceton P} + H_2O_2$$

– ***superoxid dismutaza.*** Se pare că dismutarea oxigenului este şi o importantă sursă fiziologică de H_2O_2:

$$2\,O_2 + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Superoxid dismutaza}} H_2O_2 + O_2$$

Acumularea de H_2O_2 de către bacteriile lactice în culturi aerobe se explică prin capacitatea lor mai mare de a forma, decât de a elimina peroxidul;

– ***NADH peroxidaza***, peroxidază flavinică care este foarte răspândită la bacteriile lactice şi este enzima principală responsabilă de descompunerea H_2O_2.

Aerotoleranţa. S-a constatat că majoritatea bacteriilor lactice sunt relativ aerotolerante. Sunt practic singurele bacterii Gram-pozitive aerotolerante care nu au un sistem respirator, care nu posedă citocromi şi nici catalază. Evidenţierea catalazei constituie o etapă importantă în identificarea celorlalte bacterii. Testul cu H_2O_2 pentru evidenţierea catalazelor poate da rezultate irelevante, pentru că anumite bacterii lactice posedă pseudocatalaze non-hemice, care provoacă o reacţie pozitivă. În acest caz este de preferat să se verifice absenţa citocromului III prin testul cu benzidină, test care va fi negativ pentru toate bacteriile lactice. Trebuie remarcat că citocromii pot fi produşi şi de *Lc. lactis, Ln. mesenterioides, Lb. plantarum, Lb. brevis, Pc. pentosacens*, atunci când în mediul lor de cultură se adaugă un derivat hemic precursor al citocromilor. Astfel, atunci când o cultură aerată de bacterii lactice acumulează apă oxigenată, este posibil să se evite stoparea creşterii şi distrugerea culturii prin adăugarea catalazei sau a unui derivat hemic, precursor al catalazei.

Totuşi, majoritatea bacteriilor lactice au mijloace proprii de apărare împotriva toxicităţii oxigenului, astfel:

– unii lactococi, enterococi, enterobacili produc fie o peroxidază flavinică utilizând enterococi NADH, ca reductor, după reacţia:

$$NADH + H^+ + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Peroxidază}} NAD^+ + 2\,H_2O$$

fie sintetizează o mangan-superoxiddismutază care catalizează eliminarea radicalilor liberi de oxigen după reacţia:

$$HO^- + 2\,H^+ \xrightarrow{\text{Superoxid dismutaza}} H_2O_2 + O_2$$

Această enzimă reduce astfel toxicitatea oxigenului. O întâlnim la lactococi şi enterococi;

– *Lb. plantarum* facilitează acţiunea unei pseudocatalaze non-hemice ce poate fi o mangan-catalază;

– aceeaşi tulpină acumulează ioni de Mn^{2+} care, oxidându-se, duc la dispariţia radicalilor liberi de oxigen.

Mecanismul care permite lui *Ec. faecalis* să se dezvolte fie în aerobioză, fie în anaerobioză, nu a fost bine definit, dar el arată, contrar teoriei, că fosforilarea oxidativă poate avea loc în absenţa citocromului. S-a arătat că anumiţi lactobacili nu pot să se dezvolte decât în aerobioză atunci când sunt cultivaţi în mediu cu glucoză. În acest caz intervine un sistem respirator flavinic pe bază de NADH-oxidază şi nu o NADH-peroxidază.

8.2.2.4. Consecinţele comportamentului bacteriilor lactice în aerobioză

Principala consecinţă constă în alterarea metabolismului glucidic care poate fi benefică. Într-adevăr, în prezenţa oxigenului, NADH-oxidazele şi NADH-peroxidazele generează prin intermediul mecanismelor alternative un surplus de NAD^+. Aceste mecanisme pot duce la economisirea piruvatului, acetil CoA şi acetaldehidei. La genul *Leuconostoc* produsele finale ale fermentaţiei anaerobe ale glucozei sunt în principal: lactatul, etanolul şi CO_2, dar în cazul creşterii în aerobioză acetatul înlocuieşte în proporţie mare etanolul. Într-adevăr, atunci când oxigenul este disponibil, activităţile NADH-oxidazei şi acetat kinazei sunt ridicate, în timp ce cele ale fosfat acetil transferazei şi alcool dehidrogenazei sunt scăzute, ceea ce facilitează sinteza acetatului şi conservarea fosfatului cu potenţial energetic mare. Trecerea de la sinteza etanolului la cea a acetatului dublează cantitatea de ATP produsă din glucoză. Acumularea biomasei tulpinii de *Lc. mesenteroides*, cultivată pe glucoză în aerobioză (NADH-oxidaza pozitivă), este aproximativ dublă faţă de cea obţinută în anaeroabioză. De altfel, vitezele de

creştere pe glucoză în prezenţa oxigenului sunt mai mari decât în absenţa oxigenului, ceea ce arată că viteza de formare a ATP din glucide este o etapă de limitare a creşterii la aceste bacterii.

În metabolismul aerob, celulele au tendinţa de a transforma acetil CoA mai mult în acetat (prin intermediul acetatfosfatului) decât în etanol (prin intermediul acetaldehidei).

Enzimele de tip dehidrogenază care intervin în metabolismul etanolului au nevoie de $NADH_2$ şi, ca urmare, intră în competiţie cu NADH oxidaza/peroxidaza, în timp ce acetil CoA transformată în acetat ajută la sinteza de ATP. Pe de altă parte, sinteza produşilor finali cu patru atomi de carbon (2, 3 butandiol şi diacetil) este accelerată prin disponibilizarea de oxigen, oferind avantaje bacteriilor heterofermentative. Degradarea glucidelor dublează cantitatea de ATP formată prin fosforilare, comparativ cu cea obţinută prin degradarea glucidelor la lactat.

Bacteriile heterolactice sunt aprovizionate cu acetat printr-un mecanism de sinteză, neafectat de prezenţa oxigenului. În consecinţă, bacteriile heterolactice pot profita de pe urma acestei cantităţi mari de ATP, atât prin creşterea de biomasă, cât şi prin accelerarea creşterii. Efectele sunt remarcabile în special la concentraţii mici de glucide. Creşterea aerobă permite anumitor bacterii lactice să metabolizeze substraturi cum sunt: glicerolul, manitolul, sorbitolul şi lactatul care nu poate fi utilizat în absenţa oxigenului.

8.2.2.5. Sistemul proteolitic al bacteriilor lactice

Principala funcţie a bacteriilor lactice este rapida conversie a glucidelor în lactat, rezultând scăderea *p*H-ului necesară pentru o producţie bună din punct de vedere calitativ. Sistemul proteolitic al bacteriilor lactice este important pentru creşterea acestor bacterii pe substraturi bogate în proteine. Cum bacteriile lactice sunt pretenţioase din punct de vedere nutriţional, ele necesită suplimentarea exogenă cu diferiţi aminoacizi, nucleotide, vitamine. În laptele natural, concentraţiile aminoacizilor liberi şi ale peptidelor cu greutate moleculară mică sunt suficiente doar pentru a creşte densitatea celulară, ce corespunde la 8–10 % din maximul găsit în laptele coagulat, fiind astfel sub minimum necesar pentru o producţie rapidă de acid. Deoarece densitatea celulară creşte, proteinele din lapte devin cea mai importantă sursă de azot şi un set funcţional de proteinaze şi peptidaze este necesar pentru aprovizionarea celulelor cu aminoacizi şi peptide mici.

În ultimii ani se observă o intensificare a cercetărilor referitoare la utilizarea bacteriilor lactice pentru fermentarea unei game largi de produse alimentare (lapte, brânzeturi, carne) şi produse furajere precum şi a complexului proteolitic.

Preluarea aminoacizilor şi a peptidelor este următorul pas important în utilizarea proteinelor şi peptidelor din lapte de către bacteriile lactice, procesul fiind mediat de sisteme de transport distincte. Un efect important al acţiunii

sistemului proteolitic este generarea de aminoacizi şi peptide care dau produşilor de fermentaţie proprietăţile lor caracteristice. Proteinazele bacteriilor lactice îndeplinesc primul pas în cascada reacţiilor care conduc la degradarea cazeinei.

Studiile biochimice ale proteinazelor arată că aceste enzime sunt proteine cu greutate moleculară mare, variind de la 80 la 145 kDa, având un *p*H optim între 5,5 şi 6,5, un punct izoelectric 4,4 – 4,55 şi fiind stabilizate sau activate uneori de ioni de calciu. Enzimele sunt blocate de fenilmetilsulfonilfluorură (PMSF) sau de diizopropilfluorofosfat (DIFP), fiind deci proteinaze tip serină. Este în general admis că proteinazele sunt localizate, în principal, în peretele celular. Întrucât se recomandă asocierea unui numar variabil de lactococi în fermentarea produselor lactate, activităţile proteolitice diferă în funcţie de tulpini.

8.2.3. Fermentaţia lactică, echipamente şi tehnologie

Prin fermentaţie lactică se înţelege procesul biologic în care rezultă ca produs principal acidul lactic.

Fermentaţia lactică are numeroase aplicaţii practice:

– producţia de acid lactic – în industria alimentară (conservarea cărnii, peştelui, legumelor; la prepararea şerbetului şi dulceţurilor; acidifiant al sucurilor, siropurilor etc.);
– în medicină (antiseptic);
– în industria chimică (mordant la colorarea şi imprimarea textilelor);
– în industria pielăriei;
– la prepararea laptelui acru, a iaurtului şi a altor produse lactate;
– la conservarea şi însilozarea nutreţului necesar hranei vitelor;
– la obţinerea unor băuturi din cereale, a unor specii de bere.

Materia primă (conţinând glucide) din fermentatoare cu temperatura de 45...50°C este însămânţată cu o cultură selecţionată de *Lactobacillus delbrueckii* – pentru amidon, glucoză, melase – *Lactobacillus bulgaricus* (pentru zer), *Lactobacillus plantarum* (pentru leşii bisulfitice). După 8 – 10 zile, 90 – 98% din glucidele fermentate sunt transformate în acid lactic. Pe măsură ce se formează acid lactic, el este neutralizat cu $Ca(OH)_2$ astfel încât produsul final este lactatul de calciu. Acidul lactic este separat din lactat prin adăugarea de H_2SO_4 care precipită calciul sub formă de Ca SO_4. Soluţia de acid lactic este concentrată la 50 – 80% acid lactic prin evaporare în vid, după care se purifică.

Pentru producerea de acid lactic prin fermentaţie se pot utiliza în general tehnologii standard de fermentaţii. Deşi procesele discontinue au fost utilizate în mod curent, studiile au condus la procese continue de fermentaţie. Tyagi şi colab. (1991) au analizat câteva sisteme de fermentaţie discontinue şi continue pentru producerea acidului lactic şi au prezentat comparaţii între diferite tipuri de

bioreactoare. Câteva caracteristici ale procesului de fermentare pentru producerea acidului lactic sunt prezentate în tabelele 8.2 şi 8.3.

Tabelul 8.2

Caracteristicile procesului de fermentaţie pentru producerea acidului lactic

Caracteristici	Valori şi cantităţi	Bibliografie
Temperatura, °C	43 ≈ 49 ≈ 30, 45...50 30...50	Burton (1937) Inskeep şi colab.(1956) Prescott & Dunn (1959) Snell & Lowery (1964)
*p*H-ul	6–7 5,8–6 < 6	Burton (1937) Inskeep şi colab. (1956) Snell & Lowery (1964)
Agent de neutralizare	NH_3, K_2CO_3,Na_2CO_3 $Ca(OH)_2$, $CaCO_3$ $Zn(OH)_2$, $Zn\ CO_3$	Kempe şi colab.(1950) Prescott & Dunn (1959) Lockwood (1979) Prescott & Dunn (1959)
Concentraţia iniţială în glucide, % Concentraţia finală de produşi, % Randamentul, %	5–20 < 12–15 85–90 90–95	Prescott & Dunn (1959) Peckham (1944) Prescott & Dunn (1959) Vick Roy (1985)
Concentraţia de glucide reziduale, % Concentraţia de inocul, % Timpul de fermentaţie, zile Productivitatea reactorului, kg $m^{-3}h^{-1}$ Materialul de construcţie al bioreactorului	<0,1 5–10 1–6 1–3 Lemn Oţel inoxidabil	Daly şi colab. (1939) Vick Roy (1985) Vick Roy (1985) Vick Roy (1985) Lockwood (1979) Vick Roy (1985)

Tabelul 8.3

Studii de fermentaţie continuă pentru producerea acidului lactic

Sistem	Bibliografie
Lb. bulgaricus, Lb. casei	Whittier şi Rogers (1931)
Lb. delbrueckii, glucoză, extract de drojdii şi ioni minerali	Luedeking şi Piret (1959)
Lb. Delbrueckii, hidrolizat de amidon	Childs şi Welsby (1966)
Lb. Delbrueckii, glucoză, extract de drojdii	Hanson şi Tsao (1972)
Lb. bulgaricus, fermentatoare în serie, zer	Keller şi Serhardt (1975)
Lb. Delbrueckii imobilizat în alginat de calciu, coloana fluidă folosind glucoză şi extract de drojdii	Stenroos şi colab.(1982)
Lb. Delbrueckii	Vick Roy şi colab.
Lb. Bulgaricus	Mehaia şi Cheryan (1986)
Lb. Bulgaricus	Mehaia şi Cheryan (1987)

Metodele convenţionale de fermentaţie discontinue sau continue necesită separarea celulelor de mediu la sfarşitul fiecărui proces. Pe de altă parte, imobilizarea celulelor pe suporturi solide sau pe o matrice de gel duce la apariţia rezistenţei la difuzie şi pierderilor asociate cu imobilizarea. Pentru a preveni aceste limite a fost studiată utilizarea bioreactorelor cu membrană reciclabilă şi a membranelor cu fibre "hollow".

Inhibiţia prin produs final în procesul de fermentaţie a acidului lactic şi efectele asupra productivtăţii acidului lactic au fost studiate de diferiţi autori. S-a stabilit că, datorită inhibiţiei, avantajele fermentaţiei continue nu sunt valabile în obţinerea acidului lactic şi, cu excepţia concentraţiilor foarte scăzute de substrat, rata specifică de creştere a microorganismelor devine mai dependentă de concentraţia produsului decât de concentraţia substratului. De aceea, procesele care îndepărtează produsul din mediul de fermentaţie pot îmbunătăţi eficienţa sistemului. Friedman şi Saden (1970) au folosit sisteme de dializă în cultură care au îndepărtat acidul lactic din mediu. Sistemul a menţinut o concentraţie scazută de lactat după o fază de *lag*, ducând la îmbunătăţirea ratelor de creştere specifice şi a producţiei de acid lactic. Autorii pretind că aceste rezultate confirmă efectul inhibitor al produsului final în fermentaţia lactică. Stieber şi colab. (1977) au arătat că, pentru producerea acidului lactic, fermentaţia continuă în bioreactoare cu membrană de dializă, spre deosebire de procesele continue şi discontinue, permite utilizarea unui substrat mai concentrat şi creşterea eficienţei conversiei substratului. Monitorizarea variabilelor procesului este de o importanţă majoră în cadrul fermentaţiei.

Un sistem "semi-on-line" cu flux discontinuu, care studiază fermentaţia lactică, a fost imaginat de către Nielsen şi colab. (1989). Într-un fermentator controlat de computer au fost măsurate concentraţiile şi densitatea optică ale glucozei, acidului lactic şi proteinelor. Autorii au arătat că răspunsul sistemului a fost rapid şi sigur, el putând fi folosit pentru studierea modelelor matematice de fermentaţie.

Acidul lactic produs în procesul de fermentaţie trebuie recuperat sau extras şi purificat. Câteva probleme de fermentaţie îngreunează acest lucru. De exemplu, pentru a controla *p*H-ul fermentaţiei lactice, sunt adăugaţi compuşi ca amoniacul, carbonatul de calciu şi hidroxidul de sodiu. Carbonatul de calciu precipită lactatul de calciu, care poate stânjeni producerea din acid lactic a unui material cu un anumit grad de polimerizare. Îndepărtarea acidului lactic din mediul de fermentaţie poate fi o soluţie a acestei probleme, prin împiedicarea scăderii *p*H-ului mediului. Printr-un sistem cunoscut de tip "extracţie lichid-lichid" utilizând amine, se poate realiza îndepărtarea acidului lactic din mediul de fermentaţie (San Martin şi colab., 1992). Yabannavar şi Wang (1991) au studiat producerea fermentativă-extractivă a acidului lactic de către *Lb. delbrueckii* utilizând amine terţiare (Alamim 336) şi oleilalcool la *p*H acid.

8.2.3.1. Imobilizarea bacteriilor lactice

Imobilizarea bacteriilor lactice poate facilita recuperarea culturilor bacteriene starter pentru a fi reutilizate în procesul de fermentație. Utilizarea culturilor mixte de microorganisme ridică problema stabilirii condițiilor optime pentru mai mult decât o specie microbiană în același proces. Kurosawa și colab. (1988) au coimobilizat, în perle de alginat de calciu, mucegaiul producător de α-amilază în condiții de aerobioza, *Aspergillus awamori* Nakasawa IFO 4033 și *Sc lactis* IFO 12007, o bacterie anaerobă aerotolerantă.Mucegaiul crește în apropiere de suprafața perlelor, unde este o zonă aerobă. Bacteria crește în partea centrală a perlelor, unde cantitatea de oxigen este limitată. Utilizând amidonul ca sursă principală de carbon, concentrația finală de acid lactic a fost de 25 g/l, cu un randament al producției de acid lactic de 66 %.

Prin utilizarea de microorganisme imobilizate în faza de creștere și prin electrodializă s-a obținut acid lactic. Lacroix și colab. au studiat proprietățile reologice într-o fermentație discontinuă, cu tulpina *Lb. casei* imobilizat. Groboillot și colab. (1993) au imobilizat *Lactococcus lactis* prin microîncapsulare, utilizând legarea încrucișată de interfață de chitosan. Toxicitatea agentului de încrucișare a fost observată în timpul microîncapsulării prin pierderea activității celulare. Autorii au sugerat necesitatea unui agent de încrucișare compatibil pentru a asigura viabilitatea microbiană în timpul procesului. Mehaia și Cheryan (1987) au imobilizat *Lb. bulgaricus*, într-un bioreactor tip "hollow fiber", în scopul producerii de acid lactic din zer, într-o fermentație continuă. Autorii au indicat că difuzia substratului și separarea produșilor sunt îngreunate de barierele fizice dintre substraturi și celule. Performanțe mai bune au fost obținute utilizând un bioreactor cu membrană și reciclarea celulelor.

Bügükgüngor a imobilizat *Lb. bulgaricus* în K-carrageenan, arătând că acest suport are o stabilitate mecanică și chimică mai bună decât cea oferită de gelurile alginat. Bassi și colab. au măsurat capacitatea de difuzie a acidului lactic într-un gel membrană de agaroză. O analiză a transferului de masă în fermentația acidului lactic de către celule imobilizate de *Lb. delbrueckii* în K-carrageenan a fost prezentată de Yabannavar și Wang.

8.2.4. Tehnologia de obținere a acidului lactic și a sărurilor sale

Acidul lactic, în cantități mari, se poate obține prin fermentație, cu bacterii selecționate, pe medii de cultură având la bază materii prime naturale: făină de porumb, cartofi, melasă, zer de lapte.

Fermentația lactică a glucidelor decurge după următoarea reacție, exprimată în formule brute:

$$\underset{\text{Glucoză}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{Acid lactic}}{2C_3H_6O_3}$$

Întrucât bacteriile producătoare de acid lactic sunt sensibile în mediu acid, se adaugă în timpul fermentației carbonat de calciu. În urma fermentației lactice rezultă, astfel, un amestec de acid lactic și lactat de calciu. Pentru obținerea lactatului de calciu, se efectuează o neutralizare completă cu carbonat de calciu, urmată de izolarea și purificarea lactatului de calciu prin diferite procedee:

$$2CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + CaCO_3 \longrightarrow (CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COO)_2Ca$$

8.2.4.1. Procedee de obținere a acidului lactic

Literatura de specialitate, referitoare la obținerea acidului acetic (și implicit a sărurilor sale), este foarte numeroasă și descrie diverse alternative îmbunătățite ale procedeului clasic.

În general, sunt redate metode moderne de obținere a acidului lactic în bioreactoare cu strat filtrant.Acestea sunt echipate cu membrane filtrante care imobilizează celulele de *Streptococcus faecalis*, operate continuu timp de două săptămâni.

Obținerea acidului lactic cu celule imobilizate de *Lactobacillus spp.* este inhibată de concentrația substratului (glucoza), concentrația în acid lactic, *p*H-ul fermentației și de câteva săruri ale acidului lactic. Când concentrația substratului este mai mare de 10%, *p*H-ul 4,0 și concentrația acidului lactic 6–7mg/ml, producția de acid lactic este inhibată. Dintre săruri, lactatul de calciu nu are efect inhibitor, spre deosebire de lactatul de sodiu; când ionul este NH_4^+, efectul este variabil, depinzând de tulpina utilizată.

Ca materii prime, în fermentația lactică, se utilizează diferite varietăți de glucoză precum și materii prime ce conțin amidon, cum ar fi făina de porumb, terciul de cartofi.

În afară de făina de porumb, ca materie primă se mai utilizează melasa fermentată cu *Lactobacillus salivarius*. Parametrii optimi pentru fermentația lactică în acest caz au fost stabiliți la *p*H = 5,6 și la 46°C. Adăugarea de 0,5% extract de drojdie reduce timpul de fermentație și crește producția de acid lactic cu 30%.

Zerul este folosit, de asemenea, în producția de acid lactic utilizând ca microorganism *Lactobacillus bulgaricus*. În mediul de cultură se adaugă extract de drojdie și săruri minerale. Acidul lactic s-a separat din mediul de fermentație prin cromatografie de schimbători de ioni și s-a purificat prin ultrafiltrare.

Producerea lactatului de calciu pentru uz medical şi dietetic se poate obţine şi prin hidroliza enzimatică şi fermentaţia făinii de orez.

Acidul lactic, obţinut prin biosinteză, se găseşte în mediul final de fermentaţie în concentraţie de 10–15%; există diverse procedee de izolare şi purificare a acidului lactic şi a sărurilor sale din mediul de fermentaţie până la obţinerea acestora sub formă de preparate de diferite grade de puritate. Unele procedee recomandă o purificare sumară a acestora şi apoi utilizarea în industria alimentară. În scopul utilizării în industria farmaceutică, este însă necesară o purificare avansată. Astfel, acidul lactic este izolat din mediul de fermentaţie, prin tratarea acestuia cu floculanţi organici, condiţiile optime de floculare a celulelor bacteriene şi substanţelor coloidale fiind adesea: *p*H=7, temperatura 65°C şi concentraţia de floculant de 0,08 g/l. Acidul lactic purificat este recuperat din soluţia limpede prin centrifugare şi apoi utilizat ca atare.

O. Hitomi (1989) descrie o metodă de purificare avansată a acidului lactic din mediul de fermentaţie. Acidul lactic este purificat ieftin şi continuu din mediul de fermentaţie conţinând săruri alcaline şi alcalino-pământoase ale acidului lactic prin îndepărtarea bacteriilor, cromatografie pe răşini schimbătoare de cationi, concentrare până la 80% a acidului lactic şi distilare a concentratului la presiune redusă. Mediul de fermentaţie conţinând lactat de sodiu (obţinut în bioreactor) s-a tratat cu DIAION SK 1B (schimbător de cationi); concentrarea până la 90% şi distilarea la 130°C a condus la obţinerea acidului lactic de înaltă puritate.

Acelaşi colectiv descrie un procedeu de purificare a acidului lactic din mediul de fermentaţie, precum şi aparatura aferentă. Procedeul comportă mai multe etape:

– trecerea mediului de fermentaţie pe o răşină schimbătoare de cationi pentru desalinizare;
– adsorbţia acidului lactic pe o răşină schimbătoare de anioni;
– eluarea acidului lactic de pe coloană cu un acid puternic.

Acidul lactic din lichidul de fermentaţie s-a neutralizat cu NH_3, rezultând lactat de amoniu; lichidul s-a decolorat, apoi s-a filtrat prin răşina schimbătoare de anioni. Cationitul s-a regenerat cu soluţie de H_2SO_4 1n, iar anionitul s-a regenerat cu NaOH 1n.

O variantă de prelucrare a mediului de cultură după fermentaţie cuprinde următoarele etape:

– reacţia Maillard în prezenţa sărurilor de magneziu ($MgSO_4$, $MgCl_2$ sau $MgCO_3$);
– floculare cu săruri de magneziu sau fier ori cu complecşi;
– prima adsorbţie cu cărbune activ sau ulei;
– a doua adsorbţie cu PAM (răşină schimbătoare de ioni).

Purificarea acidului lactic din mediul de fermentaţie cu făină de porumb se realizează cu îndepărtarea impurităţilor proteice, glucidelor reziduale şi a altor contaminanţi prin precipitarea lactatului de calciu. Metoda utilizează adsorbanţi, adjuvanţi de precipitare, cum ar fi varul, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$. Randamentul poate fi mărit cu 10–20%.

Un procedeu de purificare a acidului lactic fără cristalizare este aplicat în China (Wang Zhang) şi cuprinde următoarele etape:

– reacţia cu hidroxilamină (reacţia Maillard) în prezenţa sărurilor de metale alcaline drept cristalizatori;

– decolorarea pe cărbune activ (1%);

– floculare cu amestec: sare de Mg–CaO;

– decolorare pe cărbune activ;

– procedee convenţionale: evaporare, concentrare, filtrare, schimbători de ioni.

Această metodă reduce durata de izolare şi măreşte cantitatea şi calitatea acidului lactic purificat.

Komori Akiyoshi descrie un procedeu de separare şi purificare a acidului lactic prin cristalizarea lactatului de magneziu din soluţiile brute, dizolvarea în apă şi tratarea cu H_2SO_4, răcire, îndepărtarea $MgSO_4$ rezultat şi îndepărtarea $MgSO_4$ rezidual cu răşini schimbătoare de ioni; astfel, lactatul de magneziu s-a dizolvat în apă, s-a amestecat cu 75% H_2SO_4, 30 minute la 30°C, s-a răcit, s-a filtrat la 25°C şi s-a tratat cu Amberlite 120 B şi s-a concentrat până la 90,5% acid lactic.

O altă variantă de recuperare a acidului lactic din mediul de fermentaţie, descrisă de acelaşi colectiv, constă în convertirea totală a acidului lactic în sarea sa de magneziu şi evaporarea soluţiei la 50°C. Lactatul de magneziu cristalizat este reconvertit în acid lactic cu o răşină schimbătoare de ioni. Astfel, 5 l lichid de cultură filtrat conţinând 8,3 mg/ml acid lactic obţinut prin cultivarea lui *Rhizopus oryzae* în prezenţă de MgO s-a concentrat prin evaporarea până la 1 l, la temperatura de 80...90°C, rezultând 87% cristale de lactat cu particule de 30–200 μ. Sarea s-a dizolvat în apă caldă şi s-a trecut pe Ambarlite IR 120 B (H^+) pentru a obţine acid lactic.

Creşterea producţiei de lactat de calciu a fost realizată de Maslowski (1989) prin mărirea concentraţiei substratului şi precipitarea lactatului de calciu pe parcursul fermentaţiei, echilibrul fiind astfel deplasat în direcţia produsului final. Astfel, fermentaţia a 26% zaharoză cu *Thermobacterium cereale* la 50°C şi la *p*H=6,3, menţinut prin adăugare de CaO, a condus la precipitarea continuă a lactatului de calciu. Randamentul de conversie a fost de 99,6% după 3 zile.

Pentru extracţia acidului lactic din mediul de fermentaţie se mai utilizează o tehnologie combinată de electrodializă cu schimbători de ioni. Prin această metodă, randamentul de acid lactic poate ajunge la 85%, în comparaţie cu 50% obţinut prin tehnologia care utilizează metoda precipitării lactatului de calciu.

Astfel, Heriba V. Skara şi colab. (1993) recomandă utilizarea pe scară largă a electrodializei, în purificarea acidului lactic şi a lactatului de sodiu; în

ambele cazuri se realizează o concentrare de 4 ori a acidului lactic, chiar în timpul fermentației. Pentru a obține un produs de înaltă puritate se recomandă o decolorare, urmată de o reacție de dublu schimb.

Un alt colectiv (Lee și colab.) descrie producerea acidului lactic și lactatului de sodiu prin fermentație cu *Lactobacillus delbrueckii* pe un mediu conținând glucoză, extract de drojdie, săruri minerale, la 42°C cu menținerea *p*H-ului la 7,2 prin adăugarea de NaOH până la atingerea concentrației în lactat de sodiu de 24,8 g/l. În acest punct adăugarea de NaOH s-a oprit, iar *p*H-ul mediului s-a lăsat să scadă la 4,22. Mediul a fost trecut printr-un filtru și apoi printr-un schimbător de ioni, recuperarea acidului lactic din mediu fiind mai rapidă decât viteza de formare a acestuia; acidul lactic recuperat din coloană indică o productivitate de 0,98 g/l/h.

O metodă de recuperare a acidului lactic prin cromatografie de schimb ionic, din mediul de fermentație (Mantovani, 1993), constă în trecerea lichidului de fermentație filtrat pe o coloană schimbătoare de anioni în forma carbonat și eluarea acidului lactic cu $(NH_4)_2CO_3$. Ulterior $(NH_4)_2CO_3$ este îndepărtat din soluție prin încălzire. Apoi, soluția este trecută pe un schimbător de ioni puternic acid, în forma H^+. După concentrarea eluatului din a doua rășină, s-a obținut o soluție apoasă conținând 90% acid lactic.

Pentru concentrarea acidului lactic se folosește fenomenul de osmoză inversă utilizând un concentrator tubular cu membrană fină, specială pentru osmoză inversă. Fluxul crește liniar cu presiunea aplicată pe membrană și este relativ neafectat de debit. Presiunea osmotică a unei soluții de 1% lactat a fost de 280–560 kPa, depinzând de *p*H sau de gradul de disociere. Respingerea crește cu aplicarea presiunii și *p*H-ul ridicat conduce la o descreștere a fluxului (datorat în parte presiunii osmotice mari) și o creștere semnificativă a rejecției. La *p*H-ul peste 5,6, rejecția lactatului și a glucidelor reziduale a fost 97%; cu membrane de acetat de celuloză, fluxul a fost în general mai mic și rejecția lactatului a fost proporțională cu gradul de disociere la presiune joasă.

Procedeul de obținere a acidului lactic cu tulpini de *Lactobacillus delbrueckii*, descris în continuare, a fost stabilit în cadrul Institutului de Cercetări Chimico Farmaceutice București (ICCF) (Jurcoane Șt. și colab., 1994).

Procedeul cuprinde: faza de hidroliză enzimatică a materiilor prime, fermentația propriu-zisă și purificarea acidului lactic și a sărurilor sale.

Materiile prime utilizate în faza de hidroliză și fermentație au fost: mălai furajer, fosfat de amoniu și carbonat de calciu.

Pentru hidroliza amidonului din făina de porumb s-au utilizat preparatele enzimatice comerciale: Thermamyl 120L și SAN Super 240 L, achiziționate de la firma NOVO (Danemarca). Primul preparat enzimatic conține în principal α-amilază termorezistentă din *Bacillus licheniformis*. Aceasta produce o lichefiere a amidonului din porumb transformându-l într-un amestec de dextrine solubile, gradul de hidroliză al amidonului fiind de cca 20%. Al doilea preparat enzimatic

(SAN) conține în principal β-amilază, realizând hidroliza amidonului dextrinizat cu Thermamyl, până la maltoză și glucoză.

Experiențele de hidroliză enzimatică a făinii de porumb s-au efectuat în condițiile optime stabilite, care sunt prezentate în continuare.

Dextrinizarea (lichefiere). Prima fază a operației de hidroliză a amidonului s-a efectuat în condiții de laborator, stabilindu-se următorii parametri de lucru:

- concentrația enzimei Thermamyl:
  - raportată la substrat: (*E/S*): 0,46% (v/g);
  - raportată la greutatea suspensiei: 0,42% (v/g);
- *p*H optim de acțiune: 6,5;
- temperatura de lucru și timpul de acțiune { 80°C (3 ore); 110°C (30 min).

Menținerea amestecului de reacție timp de 30 de minute la 110°C se efectuează pentru sterilizarea mediului și inactivarea enzimei, înaintea celei de a doua faze de hidroliză.

Hidroliza până la glucoză și maltoză (zaharificare – termen uzual pentru această operație). Cea de-a doua fază a operației de hidroliză a amidonului se efectuează în același vas, după răcirea amestecului de reacție rezultat la faza de dextrinizare până la 65°C; condițiile optime stabilite pentru acestă fază sunt:

- concentrația enzimei SAN:
  - raportată la substrat: (*E/S*): 0,61% (v/g);
  - raportată la greutatea suspensiei: 0,057% (v/g);
- *p*H optim de acțiune: 5,5;
- temperatura de lucru: 65°C;
- timpul de acțiune: 10 ore.

Controlul analitic al procesului de hidroliză enzimatică s-a efectuat prin determinarea la diferite intervale de timp a glucidelor reducătoare eliberate. S-a urmărit, de asemenea, *p*H-ul și reacția cu iod (pentru identificarea amidonului) pe parcursul hidrolizei.

Experiențele de fermentație în laborator au fost efectuate în flacoane Erlenmayer de capacitate 3 l, în condiții statice, la temperatură constantă (42°C), pe un mediu de cultură cu următoarea compoziție:

- glucoză (din hidrolizatul de mălai) 10–12% (ca glucide reducătoare);
- fosfat diamoniacal 0,1%;
- carbonat de calciu 1% (inițial).

*p*H-ul fermentației s-a menținut în intervalul 3,8–5,2 prin corecție cu suspensie de $CaCO_3$.

Pe parcursul fermentației (durata totală: 96 ore) s-a determinat concentrația în glucide reducătoare, concentrația aidului lactic format și concentrația lactatului

de calciu. Mediul de cultură inițial s-a însămânțat (raportul de inoculare 7%) cu inocul de 24 ore cu următoarea compoziție:

- bacto-Difco-peptonă: 0,5%;
- dextroză: 1%;
- extract de drojdie Difco: 2%;
- KH_2PO_4: 0,2%;
- *p*H: 6,7–6,8.

Microorganismul producător a fost *Lactobacillus delbrueckii* cultivat și selecționat în cadrul secției Biosinteze din ICCF.

După faza de biosinteză în mediul de fermentație, concentrația acidului lactic a fost de 9–10 %. Mediul de cultură filtrat de corpii bacterieni s-a concentrat până la 50% acid lactic, produsul rezultat fiind numit "acid lactic de uz tehnic", utilizat în industria pielăriei ca mordant. Purificarea acidului lactic, până la calitatea de uz farmaceutic, s-a relizat printr-un procedeu cu schimbători de ioni.

8.2.4.2. Izolarea și purificarea lactatului de calciu

În vederea izolării și purificării lactatului de calciu din mediul de fermentație este necesară o bună separare a corpilor bacterieni. În mediul de cultură, la sfârșitul fermentației există un amestec de acid lactic (cca 2–4%) și lactat de calciu (6–7%). Există două posibilități de prelucrare a acestui amestec:

- neutralizarea acidului lactic cu $Ca(OH)_2$ rezultând lactat de calciu, separarea biomasei și a excesului de $Ca(OH)_2$ și $CaCO_3$ (rămas în urma neutralizării incomplete pe parcursul fermentației), decolorarea cu cărbune activ;
- separarea biomasei, urmată de decolorare și apoi neutralizare cu $Ca(OH)_2$ și filtrare.

Întrucât o bună decolorare cu cărbune activ a lichidului de cultură are loc în mediu acid (*p*H = 4–5), varianta a doua este mai avantajoasă.

Rezultatele satisfăcătoare în ceea ce privește viteza de filtrare și clarificarea lichidului de cultură s-au obținut în următoarele condiții:

- încălzirea mediului de fermentație la 60...70°C, cu agitare (are loc o coagulare parțială a biomasei și denaturarea diferitelor proteine din mediu);
- flocularea: sub agitare se adaugă aproximativ 0,5% floculant tensioactiv Moldosil; se lasă 30 de minute fără agitare pentru floculare;
- filtrarea sub vid cu 1% adjuvant de filtrare (de exemplu: Perlită);
- lichidul de cultură rezultat, perfect limpede, de culoare galbenă și *p*H = 4–4,5 este supus în continuare operației de decolorare cu cărbune activ și apoi este neutralizat acidul lactic aflat în amestec cu lactatul de calciu.

Pentru **decolorare** s-a utilizat cărbune activ CF-2, care s-a testat la diverse *p*H-uri ale lichidului de cultură filtrat și în diferite proporții. S-a considerat că cea mai avantajoasă variantă de decolorare a lichidului de cultură este cu 1,5% cărbune activ CF-2 la *p*H = 4.

O bună decolorare a soluției de acid lactic și lactat de calciu se realizează la *p*H = 4, temperatură 60°C, cu agitare timp de 1 oră, prin adaos de cărbune CF-2 în proporție de 1%.

Întrucât soluția obținută după filtrare și decolorare conține un amestec de acid lactic și lactat de calciu, este necesară neutralizarea acidului lactic cu o sare de calciu sau cu hidroxid de calciu. Reacția de neutralizare s-a efectuat sub agitare continuă și energică, la temperatura de 70°C, timp de 1 oră.

Neutralizarea cu $CaCO_3$ a decurs lent, fiind incompletă după o menținere prelungită la temperaturi între 70...90°C.

Reacția de neutralizare cu $Ca(OH)_2$ decurge rapid, timpul de 1 oră fiind necesar doar pentru definitivarea reacției.

Cantitatea de $CaCO_3$ sau $Ca(OH)_2$ ce trebuie adăugată pentru neutralizare se calculează conform reacțiilor:

$$2CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + CaCO_3 \longrightarrow (CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COO)_2Ca + H_2CO_3$$

$$90 \qquad\qquad 100 \qquad\qquad 218$$

$$2CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + Ca(OH)_2 \longrightarrow (CH_3{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COO)_2Ca + 2H_2O$$

$$90 \qquad\qquad 74 \qquad\qquad 218$$

Cantitatea de acid lactic existentă în mediul de cultură se determină și după neutralizare.

*p*H-ul mediului după neutralizare trebuie să fie cuprins între 6,5 și 7.

Experiențele de concentrare a soluției de lactat de calciu de la 10–11% până la 25–30% s-au efectuat în laborator pe un rotavapor sub vid tip Büchi.

Operațiile de cristalizare-recristalizare s-au efectuat în două variante de lucru:

- cristalizare din soluția apoasă în care se află dizolvat lactatul de calciu;
- cristalizare din alcool etilic apos.

Efectuarea cristalizării și recristalizării în apă a condus la un produs necorespunzător din punct de vedere al conținutului în cloruri și sulfați.

Datorită solubilității mari în apă (1g/20g apă), în această variantă de lucru nu este posibilă spălarea cristalelor cu apă. De asemenea, pentru obținerea unor randamente de izolare a produsului cât mai mari este necesară respectarea anumitor condiții în această fază.

Cristalizarea lactatului de calciu în alcool etilic și spălarea cristalelor cu alcool etilic rece conduce în final la un produs corespunzător utilizării ca medicament.

Recristalizarea s-a efectuat prin dizolvarea cristalelor în apă distilată la 80°C (astfel încât să rezulte o soluție 20% lactat de calciu) și după răcire s-a precipitat cu alcool etilic în raport de ½ (v/v).

Uscarea. Cristalele de lactat de calciu uz farmaceutic s-au uscat sub vid, prin ridicarea treptată a temperaturii (de la 30 la 60°C) timp de 24 ore.

8.2.5. Aplicații practice

Acidul lactic este produs de animale, plante şi microorganisme, fiind un hidroxiacid organic natural cu multe utilizări în procese alimentare, chimice, farmaceutice, industriale. Aproximativ jumătate din acidul lactic produs este utilizat în industria alimentară ca acidulant şi aproximativ jumătate din acidul lactic produs în întreaga lume este prelucrat prin procese fermentative. Acidul lactic există în două forme optic active: D(-) levogiră şi L(+) dextrogiră. Lockwood şi colab. au arătat că esterii şi sărurile acidului lactic L (+) sunt levogire. Ambii izomeri există în sistemul biologic şi acidul lactic rezultat prin fermentaţie se găseşte, în general, sub forma unui amestec racemic. Soccol şi colab. au arătat că izomerul L (+) este cel mai important pentru industria alimentară, fiind singurul pe care organismul uman îl poate asimila sub acţiunea (L+) lactat dehidrogenazei.

Prelucrarea comercială sintetică a acidului lactic a început în S.U.A., dar Thorne a arătat că acest tip de producţie avea deja loc şi în Japonia. Acidul lactic poate fi transformat în produse chimice importante ca etanol, propilen glicol, polimeri acrilici şi poliesteri. Ambalaje de plastic biodegradabil pot fi produse dintr-un copolimer de acid lactic.

Caracteristicile diferitelor tipuri de acid lactic comercializat sunt indicate în tabelul 8.4, iar în tabelul 8.5 sunt prezentate câteva dintre cele mai importante utilizări ale acidului lactic.

Tabelul 8.4

Caracteristicile acidului lactic

Proprietăţi	Caracteristici
Activitate optică	Există ca izomer L(+), D(-) şi amestec racemic
Cristalizare	Formează cristale monoclinice, mai puţin colorate, de puritate înaltă
Culoare	Nu este galbenă
Miros	Nu
Consistenţă	Sirop lichid
Solubilitate	Solubil în orice proporţie
Miscibilitate	Miscibil cu apă, alcool, glicerol, furfurol Insolubil în cloroform
Volatilitate	Scăzută
Esterificare	În soluţie > 20% formează un dimer ciclic sau un polimer linear
Fizice	Greutate moleculară = 90,1; punct de fierbere 122°C la 15 mm Hg; $\alpha = 1,2$; punctul de topire 18°C, acceleraţie gravitaţională 1,248.

Tabelul 8.5

Tipuri calitative de acid lactic comercializat (după Lockwood, 1979; Vick Roy, 1985)

Produs	Puritate	% Aciditate totală	Caracteristici
Farmaceutic	Foarte mare	85%	Tehnologie de preparare laborioasă; incolor; 30% polimerizat
Alimentar	Medie	≈ 50	Galben deschis
Tehnic	Foarte mică	44–45	Concentrații mai mari de contaminuanți, de exemplu: glucide, sulfați, cenușă, cloruri

Rolul fermentației lactice în biodegradarea și în bioconversia unor produși este foarte important. Multe dintre aceste operații sunt înrudite cu producția compușilor folosiți în hrana animalelor. Lockwood a arătat care sunt aspectele economice ale producției comerciale de acid lactic.

Una dintre aplicațiile acidului lactic care are un impact ecologic și biotehnologic deosebit este folosirea sa în producția materialelor plastice biodegradabile. Din punct de vedere nutrițional, izomerii D (-) și L(+) ai acidului lactic au efecte diferite. În timp ce L(+) este metabolizat în gluconeogeneză, aceasta fiind calea urmată de acidul lactic produs în metabolismul uman, D(-) este excretat sau oxidat în ficat. S-a demonstrat că D(-) poate să producă reacții nedorite la copiii mici. Se recomandă ca și adulții să-și limiteze consumul de acid lactic D(-) până la 100 ml/kg corp/zi. Unul din produșii care aduc acidul lactic D(-) în dietă este varza acră.

În zootehnie lactatul de calciu se folosește ca aditiv furajer în amestec cu porumb, carbonat și fosfat de calciu.

Un aditiv pentru hrana animalelor se obține prin amestecarea pulberii de zeolit cu zahăr, aminoacizi, acid lactic și H_2O.

Competiția pentru substraturi și inhibiția prin metaboliți. În majoritatea bioproceselor care fac apel la o fermentație lactică și recurg la cultivarea în amestec de tulpini, din specii și chiar din genuri diferite, asocierea tulpinilor ridică problema interacțiunii lor. Dacă aceste interacțiuni sunt benefice pentru una sau mai multe tulpini, aceasta este o dovada a cooperarii. Dacă ele sunt dăunatoare aceasta este o dovadă a inhibiției. Compararea comportamentelor metabolice (viteză de creștere sau de acidifiere sau de producere a metaboliților specifici) ale tulpinilor cultivate singure sau în amestec constituie criteriile cele mai des folosite în determinarea numărului de interacțiuni.

Atunci când mai multe tulpini de bacterii lactice sunt cultivate în același mediu, ele intră în mod obligatoriu în competiție dacă folosesc același intermediar. Competiția se poate declanșa chiar și pentru un component de substrat; de

exemplu, în cazul culturilor mixte de Sc. *thermophilus* şi *Lb.helveticus*, pe lactoză, streptococul asimilează greu galactoza şi asemenea lactobacilului asimilează mai întâi glucoza. Deci, există în special la începutul fermentaţiei o competiţie în utilizarea simultană a aceluiaşi substrat. În plus, s-a dovedit că galactoza care este inhibitor competitiv al galactozidazei induce inhibiţia anumitor tulpini de *Sc.thermophilus*. Faptul că o cantitate mică de galactoză este consumată de acest streptococ explică inhibiţia acestor bacterii spre sfârşitul creşterii lor în cultura mixtă de lactobacili thermophili, la un *p*H constant. Totuşi, producţia acidului lactic rămâne cea mai importantă dintre cauzele inhibiţiei activităţilor metabolice ale bacteriilor lactice în culturile mixte. Acidul produs se găseşte în soluţie şi este supus urmatoarei reacţii:

$$CH_3CHOH\,COOH + H_2O \Leftrightarrow CH_3\,CHOH\,COO^- + H_3O^+$$

În mediu acid predomină forma moleculară. Din contră, în mediu alcalin sau neutru mai importantă cantitativ este forma ionizată. Aceste două forme stau la originea celor două tipuri de inhibiţie, dintre care unul sau altul poate deveni dominant în funcţie de condiţiile de *p*H. Dacă *p*H-ul nu e menţinut constant, inhibiţia este exercitată de ionul H_3O^+. Dacă *p*H-ul este reglat la un nivel slab acid, de exemplu *p*H = 6, ionul $CH_3\,CHOH\,COO^-$ este prezent într-o cantitate mai mare şi inhibiţia seamănă cu una datorată excesului de concentraţie salină. Aceste două sisteme de inhibiţie, inhibiţia prin ionul H_3O^+ şi inhibiţia datorată excesului de concentraţie salină, sunt foarte diferite şi pot să nu aibă acelaşi efect pe culturi mixte. Se poate lua exemplul culturii mixte de S. *thermophilus* şi *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus:*

– dacă *p*H-ul nu este reglat, lactobacilul continuă să crească chiar şi după stagnarea creşterii streptococului;

– dacă *p*H-ul este reglat (între 5,5 şi 6,5), creşterea celor două tulpini se opreşte în acelaşi timp. La *p*H reglat dispare inhibiţia prin ioni H_3O^+ care în mod obişnuit este funcţie de specie.

Fenomene de cooperare metabolică. Contribuţia prin producţia de nutrienţi azotaţi. Bacteriile lactice au foarte mare nevoie de nutrienţi azotaţi, constatându-se, de asemenea, că aportul exogen de aminoacizi şi de peptide cu greutate moleculară mică stimulează creşterea şi producţia de acid, în special a *Sc.thermophili.* S-a arătat că lactobacilii termofili au o pronunţată capacitate proteolitică şi produc, pe baza proteinelor complexe, compuşi azotaţi cu greutate moleculară mică. Astfel se poate explica şi stimularea *Sc.thermophilus* cultivat în asociere cu *Lb.delbrueckii ssp. bulgaricus* sau cu *Lb. helveticus.*

Importanţa proteazelor a fost subliniată şi în cazul lactococilor, ale căror tulpini sunt adesea constituite din două populaţii diferite, una care produce proteaza, varianta Prt^+, cealaltă lipsită de protează, varianta Prt^-. Cultivată singură, varianta Prt^- este stimulată de adăugarea unui hidrolizat de cazeina, ceea ce

conduce la ipoteza că în mediile naturale creşterea unor astfel de organisme este stimulată de produsele de proteoliză ale variantei Prt^+.

Cooperarea prin modificarea condiţiilor de mediu. În timpul unei fermentaţii lactice au loc simultan două fenomene importante: scăderea *p*H-ului mediului şi eventuala eliminare a compuşilor inhibitori. În culturile mixte scăderea *p*H-ului este, de obicei, mai rapidă şi mai pronunţată, ceea ce se explică prin stimularea a cel puţin uneia dintre tulpinile amestecului. Pentru că bacteriile lactice sunt în majoritate organisme facultativ anaerobe, orice factor care diminuează concentraţia de oxigen dizolvat în mediu de cultură le stimulează creşterea şi favorizează producţia de acid lactic. Astfel, prezenţa într-un amestec de tulpini a bacteriilor care acceptă concentraţii mari de oxigen dizolvat (cum sunt *Ec. faecalis, Lb. mesenteroides, Lb.plantarum)* favorizează tulpinile mai puţin tolerante.

Cooperarea prin producerea de metaboliţi specifici. În cazul culturilor mixte de bacterii lactice termofile s-a arătat că acidul formic produs de *Sc.thermophilus* poate sta la originea stimulării *Lb.delbrueckii spp.bulgaricus*. Într-adevăr, acidul formic este implicat în sinteza de adenină, compus care stimulează creşterea lactobacilului. Pe de alta parte, *Sc. thermophilus* poate stimula producţia de acid a *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* prin intermediul CO_2 pe care-l produce, favorizând sinteza acidului aspartic de către lactobacili. Producţia de CO_2 de către *Sc. thermophilus* în lapte se datorează în parte activităţii unei ureaze care descompune ureea din mediu.

8.2.6. Biosinteza bacteriocinelor

Abilitatea bacteriilor lactice de a produce bacteriocine a fost prezentată pentru prima dată în 1928 de către Rogers pentru *Lactococcus lactis* şi *Lactobacillus bulgaricus*. Bacteriocinele formează o clasă de substanţe antibiotice cu acţiune bactericidă, sintetizate de anumite tulpini bacteriene, datorită informaţiei genetice conţinute în structura unor plasmide. Încercările de a defini cadrul conceptului de bacteriocine nu a dus la o soluţie universal acceptată, ci numai la stabilirea unor criterii, în general aplicabile bacteriocinelor produse de bacteriile Gram-pozitive, şi anume:

- bacteriocinele au un spectru de activitate limitat, centrat în jurul speciei omoloage;
- modul de acţiune esenţial al bacteriocinelor este bactericid;
- conţin totdeauna o componentă biologic activă de natură proteică;
- se leagă de celule sensibile prin intermediul unor receptori celulari specifici;
- sinteza bacteriocinelor, ca şi imunitatea celulei-gazdă, este asigurată de gene plasmidiale;
- biosinteza bacteriocinelor are efect letal pentru celula producătoare.

Bacteriocinele sunt prezente întotdeauna în cantități mici în culturile de bacterii lactice. Producția lor crește în urma procesului de producție, care poate fi declanșat cu aceleași tratamente care măresc frecvența inducției lizogene. Ca rezultat al inducției, celula producătoare moare, ca și în cazul bacteriilor infectate cu fagi virulenți.

8.2.7. Probiotice

Microorganismele vii utilizate ca probiotice, în alimentația animala, sunt tulpini bacteriene aparținând grupurilor *Lactobacillus, Enterococcus* și *Bacillus* și eventual drojdii din genul *Saccharomyces.*

Lactobacillus și *Enterococcus* sunt genuri bacteriene prezente în cantități importante (10^4 – 10^8/g) în microflora digestivă a porcilor, vacilor și păsărilor. Din contră, tulpinile din genul *Bacillus* și drojdiile nu sunt locuitori obișnuiți ai florei digestive. Dacă ameliorarea obținută prin ingestia de proteine este clasic admisă, mecanismele de acțiune, în ceea ce privește organismele vii, sunt și în prezent controversate, acestea trebuind să îndeplinească o serie de condiții pentru a putea acționa benefic asupra organismului animal. Pentru ca un microorganism să poată fi utilizat ca probiotic trebuie să întrunească o serie de criterii prealabile și anume:

- condiții specifice de implantare;
- rezistență la lizozim;
- toleranță la aciditatea gastrică;
- rezistență la săruri biliare.

8.2.7.1. Condiții de implantare a microorganismelor probiotice

Microorganismele utilizate ca probiotice trebuie să depășească, în principal, trei obstacole majore în scopul tranzitării digestive înainte de implantarea și multiplicarea în intestinul subțire:

- în gură, ele sunt supuse acțiunii litice a lizozimului, prezent în cantitate mare în salivă;
- în stomac, trebuie să reziste la acțiunea unui *p*H foarte acid;
- în intestinul subțire, trebuie să reziste la acțiunea sărurilor biliare.

Rezistența la enzimele litice. Printre enzimele litice capabile de a liza peretele celular al bacteriilor Gram-pozitive, lizozimul pare a fi o enzimă deosebit de agresivă. Lizozimul este o β 1-4-glucanază care scindează specific legăturile β 1-4 dintre acidul muramic și resturile glucozaminice din partea glucidică a peptidoglicanului, care reprezintă 80–90% din substanța uscată a peretelui celular al bacteriilor.

Microorganismele Gram-pozitive prezintă o sensibilitate deosebită la acțiunea lizozimului, care poate liza chiar și celule aflate în faza staționară de creștere, când pereții celulari sunt îngroșați. Acțiunea litică a lizozimului este

potențată de către tripsină, care are rol benefic prin hidroliza părții peptidice a peptidoglicanului din peretele celular, favorizând accesul lizozimului la scindarea legăturilor β 1-4 dintre acidul muramic și N acetilglucozamina.

Bacteriile lactice posedă însă o rezistență naturală la efectul litic al lizozimului, ceea ce permite trecerea lor prin bariera bucală. Rezistența naturală a bacteriilor lactice poate fi explicată prin modificarea structurală a pereților celulari, semnalată la *Lactobacillus bulgaricus*, când peretele celular este sensibil la activitatea enzimelor autolitice dar nu și a lizozimului.

Rezistența la *p*H-ul gastric. Pentru evaluarea toleranței tulpinilor la activitatea stomacală, tulpinile sunt supuse acțiunii unui suc gastric artificial, la *p*H = 3 și la temperatura de 37°C. În aceste condiții, bacteriile lactice au prezentat o viabilitate de 100%, timp de 3 ore, în timp ce *Bacillus subtilis* și drojdia metilotrofă *Hansenula polymorpha* au prezentat o viabilitate cuprinsă între 50 și 70%

Rezistența la sărurile biliare. Rezistența bacteriilor față de sărurile biliare se determină pe medii selective conținând bilă. Tulpinile care se dezvoltă pot fi considerate gazde obișnuite ale intestinului. Există o relație strânsă între rezistența tulpinii la sărurile biliare și capacitatea de a coloniza intestinul subțire.

În concluzie, pentru ca o bacterie lactică să poată fi utilizată ca aditiv alimentar, cu rol de probiotic, este necesară o rezistență simultană la acidul gastric, la atacul enzimelor digestive și la acțiunea antibacteriană a sărurilor biliare.

Efectele probioticelor. Efectele probioticelor pot fi clasificate în efecte directe și efecte indirecte. Dintre efectele indirecte se menționează:

- acidifierea mediului;
- eliberarea de substanțe antibiotice și alți metaboliți cu acțiune antibacteriană;
- efectele enzimatice;
- efectele parietale;
- efectele imunomodulatoare;
- efectele de excludere competitivă a florei patogene;
- efectele nutriționale directe.

Efectele indirecte, ale căror mecanisme sunt încă neelucidate, pot fi:

- efecte asupra tranzitului intestinal;
- protecție ecologică de echilibrare a florei endogene;
- efect sanitar.

Probioticele induc în tubul digestiv al animalelor o serie de reacții utile, printre care acidifierea mediului este de importanță majoră. La rândul ei, reacția acidă inhibă formarea de amine toxice și permite producerea de substanțe antibiotice. Este inhibată, de asemenea, multiplicarea germenilor patogeni de tipul colibacililor și salmonelelor. Enzimele conținute în probiotice pot ameliora digestia propriu-zisă și pot corecta unele deficiențe digestive ca, de exemplu, cele apărute în digestia lactozei.

Se poate constata un efect nutriţional direct prin aportul de microorganisme în tubul digestiv, în cazul drojdiilor, acestea fiind o sursă *in vivo* de proteină, vitamine, aminoacizi.

Dintre efectele indirecte, se remarcă efectul sanitar al probioticelor, acestea intervenind în refacerea aparării naturale, a sănătăţii în condiţii de stres.

Acidifierea mediului digestiv. Lactobacilii formează rapid acid lactic din glucide şi în special din lactoză, ceea ce duce atât la diminuarea diareii la tineretul animalier, cât şi la o protecţie antimicrobiană împotriva salmonelelor sau a altor bacterii patogene sensibile la *p*H scăzut.

Producţia de acizi organici (lactic şi acetic) de către lactobacili este regulatorul primar al activităţii florei intestinale. Acidul lactic produs va fi metabolizat, la rândul său, de bacteriile utilizatoare de lactat, la acid formic, care va conduce la scăderea *p*H-lui în tractul intestinal, inhibând dezvoltarea microorganismelor patogene acido-sensibile. Concomitent creşte concentraţia formelor moleculare ale acizilor slabi, acidul acetic şi formic care penetrează în celule exercitând un puternic efect inhibitor. În această fază, teoretic, ar fi benefică prezenţa unei drojdii, care este capabilă să metabolizeze acidul formic pentru a nu se forma o concentraţie excesivă, locală, cu efect dăunător.

Metaboliţi cu acţiune inhibitoare. Componentele inhibitoare eliminate de lactobacili cuprind producerea de bacteriocine şi metaboliţi toxici ai oxigenului şi acizilor organici.

Spectrul inhibitor al bacteriocinelor este diferit. Majoritatea lor inhibă bacteriile Gram-pozitive din genul *Lactobacillus* sau genuri înrudite taxonomic cu acesta. Alte bacteriocine ca, de exemplu: bulgaricina, acidolina, lactocidina, acidofilina şi reuterina (substanţă neproteică) sunt active faţă de un spectru larg de bacterii, drojdii şi fungi. Între substanţele cu activitate antibacteriană se disting substanţe nepeptidice şi bacteriocine dotate cu un situs activ de natură proteică. Din prima categorie face parte reuterina produsă de *Lactobacillus reuteri*, care are proprietăţi de antibiotic cu spectru larg faţă de: bacterii Gram-pozitive, Gram-negative, drojdii, protozoare. Reuterina este un derivat de glicerol-β-hidroxipropion-aldehida.

Proprietăţile biochimice ale bacteriocinelor, structura şi natura lor, sunt determinate genetic, prezentând o mare variabilitate.

Biosinteza bacteriocinelor apare în timpul sau la sfirşitul fazei exponenţiale de creştere a tulpinii producătoare. În general, ele sunt produse extracelulare, dar o parte a activităţii antimicrobiene poate fi reţinută pe celule.

Acţiunea bacteriocinelor asupra celulelor microbiene este un proces în două etape. Prima fază este adsorbţia bacteriocinelor pe receptori specifici sau nespecifici ai bacteriei-gazdă. În acest timp, bacteriocinele sunt sensibile la acţiunea proteazelor. A doua faza, ireversibilă, induce schimbări patologice în celula-ţintă specifică fiecărui bacteriocid. Acest proces a fost descris pentru bacterii Gram-pozitive, dar nu este clar dacă este aplicabil şi bacteriilor lactice.

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI F 1 7 1 C A

Dintre metaboliții toxici ai oxigenului o importanță deosebită o are apa oxigenată. Aceasta, împreună cu sistemul lacto-peroxidaz-tiocianat, exercită un efect bacteriocid asupra majorității microorganismelor patogene.

Efectele enzimatice. Enzimele conținute în probiotice și vehiculate pe cale orală pot fi active în intestin. Astfel, câteva bacterii lactice ingerate în alimentația umană o dată cu produsele lactate fermentate participă la digestia lactozei în cazurile cu deficiență în lactază. *Saccharomyces cerevisiae* ajută la digestia zaharozei la copiii cu deficiență în sucrază. Prezența în probiotice a unor spori de *Bacillus* înalt producători de lipază, amilază și protează poate crește digestibilitatea unor furaje mărind gradul de asimilare al acestora. Prin eliminarea de enzime digestive este favorizată digestia avansată a lipidelor, proteinelor și glucidelor în tractul digestiv. Prezența concomitentă a unei specii de *Bacillus* cu propietăți de producător de enzime digestive, cât și litice, și a unei tulpini de drojdie cu pereți celulari sensibili la atac litic, poate contribui la îmbogățirea substanțială a mediului intestinal cu proteine, aminoacizi, vitamine, fosfor, calciu, magneziu, fier, provenite prin digestia *in vivo* a acesteia.

Efectele parietale. Câteodată, microorganismele în tranzit pe tractul intestinal pot influența activitatea enterocitelor. Astfel, ingestia de *Saccharomyces boulardii* eliberează câteva enzime pe mucoasa intestinală.

Efectele imunomodulatoare. Câteva tulpini din genul *Bacillus* exercită efecte imunomodulatoare. Administrarea unei doze puternice de bacterii stimulează producerea de gama interferon, prin limfocitele circulante. Administrarea câtorva tulpini de lactobacili la nou-născuți atenuează gastroenteritele, stimulează imunitatea și diminuează semnificativ durata diareelor.

Prezența bacteriei *Sacharomyces boulardii* în tractul digestiv exercită un efect pozitiv asupra sistemului imunitar, favorizând secreția și producerea de anticorpi, în special imunoglobuline A în lumenul intestinal.

Studii recente cu diferite specii de *Bacillus* au pus în evidență stimularea sistemului limfocitar de tip uman. S-a demonstrat că acestea pot produce *in vivo* un tip de antibiotic-bacitracina – și pot coexista cu tulpini din genul *Lactobacillus*, dar fără ca tulpina de *Bacillus* să producă mai mult antibiotic.

Alte experimentări sugerează o activitate antitumorală rezultată din activarea sistemului imunitar. Rezultate semnificative au fost obținute, de asemenea, și cu compuși ai pereților celulari ai bacteriilor lactice, cum ar fi glicopeptide provenite din lizate celulare de *Lactobacillus bulgaricus* sau peptidoglicani (muramyl-peptide).

Efectele de inactivare a unor compuși toxici. Inactivarea unor compuși toxici, prin intermediul bacteriilor lactice, reprezintă un alt aspect important al acțiunii directe a probioticului în terapia cu bacterii lactice. Când microflora intestinală nu este echilibrată, se pot acumula fenol și indol rezultate din procesul de putrefacție. Acești compuși toxici sunt prezenți în mod normal într-o condiție fiziologică bună, dar în cazul disfuncțiilor hepatice se pot acumula în sânge

producând intoxicații. S-a demonstrat experimental că reechilibrarea microflorei intestinale cu bacterii lactice permite reducerea concentrațiilor de fenol și indol. Trebuie subliniat faptul că bacteriile lactice, cum ar fi *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* și *Lacococcus lactis ssp lactis*, au o foarte mare capacitate de a degrada aflatoxina B_1, considerată ca una dintre cele mai toxice substanțe pentru organism.

Efectele de excludere competitivă a florei patogene. Adesea, probioticele au capacitatea de a supraviețui în intestin și de a adera la epiteliul intestinal. Probioticele secretă substanțe antimicrobiene, acide sau bacteriocine. Aceasta permite explicarea efectelor protectoare asupra florei endogene și antagonice vizavi de cele patogene. Sunt de notat efectele pozitive în domeniul prevenirii și tratamentului unor infecții intestinale cu *Clostridium difficile*.

Studii recente au evidențiat că *Lb. casei* favorizează un răspuns imunitar împotriva infecțiilor datorate rotavirusurilor și că administrarea de culturi liofilizate în lapte sau lactoseruri fermentate de *Lb.casei* permite înlăturarea diareilor datorate rotavirusurilor. Laptele fermentat și preparatele farmaceutice, care conțin un mare număr de bacterii lactice vii, constituie un antidot eficace împotriva infecțiilor enteritice, a căror frecvență astăzi este în creștere la turiști și călători. Într-un context general, acțiunea bacteriilor lactice asupra germenilor enteropatogeni este de natură terapeutică sau profilactică și trebuie avută în vedere în scopul protecției consumatorilor.

Efectele protective ale bacteriilor lactice în tratamentul cu antibiotice. Adesea, probioticele protejează semnificativ efectele indezirabile ale terapiei cu antibiotice. Un interes deosebit în acest sens îl deține *Sacharomyces boulardii, Streptococcus faecium 5F68* și câțiva lactobacili.

Practic, toate familiile de antibiotice, cu excepția vancomicinelor și a celor conținând monoglucide, sunt susceptibile de a provoca diaree, cu frecvențe variabile în special în cazul speciilor anaerobe din flora dominantă și la concentrații ridicate ale antibioticelor. Presiunea selectivă a antibioticelor se exercită asupra microflorei digestive, care la nivel fiziologic formează un ecosistem bazat pe un echilibru armonios al florei intestinale și al mucoasei digestive. Acest echilibru rezultă din mecanisme complexe în care flora microbiană exercită o acțiune fiziologică asupra gazdei, ca sinteza vitaminelor, degradarea glucidelor, lipidelor și proteinelor alimentare, având impact asupra reînnoirii celulelor cu rol în tranzitul intestinal. De asemenea, o serie de factori ai gazdei, ca acela al mecanismelor imunologice, secreția IgA, peristaltismul intestinal, tipurile de alimentație, influențează și controlează echilibrul microbian digestiv. În acest sistem interactiv, flora bacteriană normală, formată din 10^{14} bacterii și aparținând la peste zece specii, exercită un efect de barieră sau rezistență la colonizare, care se opune implantării de bacterii noncomensuale; flora strict anaerobă, cea mai abundentă, dominantă, joacă un rol major.

În terapia specifică destinată să reechilibreze flora intestinală perturbată drastic de către tratamentul cu antibiotice s-au propus corecții ale concentrațiilor electrolitice asociate cu aportul de microorganisme nepatogene, selecționate ca probiotice, care să realizeze un nou echilibru ecologic intestinal. Pentru a fi potențial eficiente, este important ca aceste microorganisme să poată trăi în tubul digestiv la nivel satisfăcător, pentru a crea efectul de barieră. Aceste microorganisme trebuie să fie insensibile la principalele antibiotice utilizate în tratamente curente.

Există câteva specii microbiene care sunt acceptate ca preparate antidiareice. Dintre acestea două sunt drojdii, și anume: *Saccharomyces boulardii* și *Saccharomyces cerevisiae*, iar șase sunt bacterii: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus cereus I.P.5832*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum.*

Efectele sanitare profilactice. Condițiile de îngrijire, stresul la înțărcarea vițeilor de lapte sau la transportul mai lung al animalelor, infecțiile intercurente sunt capabile să favorizeze implantarea și invazia organismului cu bacterii patogene: *Salmonella,Escherichia coli*, *Clostridium* etc. Rolul probioticelor ar consta în refacerea apărării naturale a stării de sanătate. Sunt posibile trei tipuri de mecanisme:

- creșterea rezistenței prin colonizarea tubului digestiv;
- reducerea translației bacteriene patogene la nivelul ganglionilor limfatici intestinali;
- stimularea imunității locale.

8.2.7.2. Obținerea probioticelor bacteriene utilizate în hrana animalelor

Termenul de probiotic a fost utilizat pentru prima oară în 1965 de către Lilly și Sillwell, pentru a defini "organisme sau substanțe care contribuie la echilibrul microbian al intestinului".

Probioticele sunt culturi selecționate și concentrate de bacterii lactice, aparținând, de regulă, tulpinilor de *Lactobacillus acidophilus* și *Streptococcus faecium* sau de *Bacillus*.

Probioticele administrate în dieta animalelor favorizează devoltarea, previn și tratează anumite boli, cresc producția de lapte, diminuează stresul la înțărcare, față de martorii cu dietă lipsită de acestea.

Lactobacilii necesari probioticelor sunt prezenți în: produsele lactate acide, unt, brânzeturi, smântână, bere, vin, suc de legume, plămezi de la fabricarea spirtului.

Probioticele, după o administrare orală, sunt capabile să se colonizeze în tractul digestiv și să păstreze sau să determine o creștere a florei naturale digestive, prevenind dezvoltarea microorganismelor patogene și asigurând securitatea utili-

zării optime a hranei. Ca parte a florei naturale, exercită efecte pozitive prin intermediul excluderii competitive şi a producţiei de substanţe antimicrobiene (se produce acid lactic, care reduce *p*H-ul interstinal, devenind nefavorabil pentru anumite bacterii patogene şi favorizând activităţi enzimatice).

Microorganisme utilizate în producţia industrială de probiotice. Cele mai utilizate microorganisme ca probiotice fac parte din genurile *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*.

Pentru obţinerea probioticelor se folosesc microorganisme selecţionate. În ceea ce priveşte alegerea optimă a unui microorganism probiotic, trebuie avute în vedere, pe cât posibil, următoarele:

– tulpina microbiană trebuie să prezinte rezistenţă faţă de enzimele litice salivare şi din tubul digestiv;

– să aibă rezistenţă la *p*H-ul scăzut din stomac mai mult de câteva ore;

– să fie rezistentă la acţiunea sărurilor biliare (în mod normal, microflora autohtonă nu prezintă probleme);

– probioticul trebuie să producă un *p*H scăzut pentru a preveni dezvoltarea germenilor patogeni şi pentru a reduce producerea de toxine şi alte substanţe nedorite;

– să fie rezistentă la antibioticele adăugate în hrană;

– tulpina microbiană utilizată trebuie să prezinte capacitate de aderare la celulele peretelui intestinal;

– bacteriile trebuie să se afle în stare vie (uşor de proliferat *in vivo* şi *in vitro*);

– este importantă rezistenţa microorganismului utilizat ca probiotic în procesul tehnologic de obţinere a preparatului final.

Materii prime utilizate pentru dezvoltare. Se ştie că laptele constituie mediul ideal pentru întreţinerea şi cultivarea lactobacililor; ei cresc, deci, foarte bine pe mediul de lapte, dar şi pe alte medii, cum ar fi: plămezi amidonoase de porumb sau cartof, zaharificate; zerul de la fabricarea brânzeturilor, melasă.

Bacteriile lactice fermentează următoarele zaharuri: glucoza, fructoza, galactoza, manoza, ramnoza, arabinoza, xiloza.

Condiţii de cultivare şi obţinere a probioticelor

Obţinerea culturii stoc şi a culturii de lucru. Culturile stoc se întreţin pe medii nutritive agarizate repartizate în tuburi înclinate. Mediul de întreţinere se stabileşte pentru fiecare microorganism în parte. De exemplu, pentru microorganismul *Lactobacillus delbrueckii* se foloseşte mediul cu următoarea compoziţie:

– extract de malţ: 4%;

– agar de malţ: 2%;

– *p*H = 6,8; sterilizare: 120°C, 30 min.

Obținerea inoculului. Pentru obținerea unui inocul se folosește un mediu lichid având compoziția:

- peptonă: 0,5%;
- glucoză: 1%;
- extract de drojdie: 2%;
- *p*H = 6,7–6,8, sterilizare la 110°C, 20 min.

Se repartizează în flacoane de capacitate 750 ml câte 250 ml mediu per flacon.

Mediul inoculat se incubează la 38°C pe masa vibratoare cu agitare, timp de 48 de ore.

Fermentația la flacoane. Pentru fermentația la nivel de flacoane, se utilizează un mediu cu compoziția:

- extract de porumb: 4%;
- glucoză: 5%;
- săruri minerale: 0,5%.

Se pregătește un mediu de fermentație cu extract de porumb și glucoză, repartizând câte 50, 100, 200 ml/flacon. După sterilizare și răcire se însămânțează cu câte 10% inocul, menținându-le apoi static la 38...39°C timp de 48 de ore. În timpul celor 48 de ore se corectează *p*H-ul cu carbonat de calciu.

Se urmărește în timp fermentația, determinându-se numărul de celule de lactobacili/ml.

Biosinteza la nivel micropilot. Pentru biosinteza la nivel micropilot se alege un mediu optim de biosinteză stabilit în laborator și apoi se stabilesc parametrii optimi de cultivare în bioreactor (temperatură, *p*H, concentrație, O_2 dizolvat) prin efectuarea de șarje în diferite condiții.

Pe parcursul biosintezei se urmărește din 3 în 3 ore creșterea numărului total de germeni/ml (NTG/ml). Când acesta devine $>10^7$, se consideră că biosinteza este încheiată.

Prelucrarea mediului de cultură. Probioticele obținute din drojdii și bacterii se prezintă sub formă de pulbere, lichid, pastă sau granulate. Pulberea se obține fie prin uscare în tăvi și apoi majorare, fie prin atomizare. Se obțin produse ale căror NTG = 10^6–10^7 germeni/g.

Titrul de viabilitate variază de la un produs la altul și trebuie specificat de fiecare dată, fiind necesar în testările pe animale.

Testarea probioticelor în hrana animalelor. Probioticele se adaugă în special în hrana animalelor tinere, urmărindu-se efectul bioproductiv și starea de sănătate a animalelor.

Cultura de bacterii se adaugă într-un furaj (porumb, soia, făină de carne) în proporție de 1 x 10^3, 1 x 10^4 sau 1 x 10^6 germeni/gram hrană.

Cultura de bacterii intensifică semnificativ conversia hranei, creșterea uniformă a corpului și producția de carne, comparativ cu martorii.

În tabelul 8.6 sunt prezentate câteva produse probiotice comercializate pe plan mondial.

Tabelul 8.6

Produse probiotice comercializate pe piața mondială

Produsul	Firma	Bacteriile conținute	Recomandările producătorului	
			Specia/ Categoria	Efecte benefice
ALL-LAC	Alltech.Inc.-S.U.A.	Lactobacili	Tineret porcin	Reduce mortalitatea Crește sporul mediu zilnic
PROTEXIN	Probiotics Int. M.Britanie	*S. faecium*, *S. thermophillus*, *Bifidobacterium bifidum*, *L.acidophillus*, *L. bulgaricus*	Cabaline, ovine, porcine	Profilactic antistres, anti *E.coli*/ *Salmonella* Îmbunătățește performanțele productive
PROBIOS	Pioneer Hi-Bred	*L.acidophillus*, *L.casei*, *L.plantarum*, *S.faecium*	Viței, porcine	Îmbunătățește starea de sănătate și performanțele productive
TOYOCERIN	Toyo-Iozo Japonia	*Bacillus toyoi*	Porci, păsări	Reprimă dezvoltarea germenilor patogeni Atenuează stresul

Modul de acțiune al probioticelor. S-au emis mai multe ipoteze, dar în principal trebuie avute în vedere următoarele:

– probioticele inhibă proliferarea bacteriilor patogene prin producerea de acizi organici și prin reducerea *p*H-ului;

– produc apă oxigenată și previn aderarea bacteriilor patogene la peretele intestinului;

– prin enzimele proprii, probioticele măresc utilizarea digestivă a hranei, precum și procesele de detoxifiere;

– probioticele stimulează producția sistemului imunologic, acționând ca barieră de protecție a tubului digestiv, fiind demonstrat că administrarea de preparate cu *Lactobacillus* poate stimula producția de gamaglobuline;

– probioticele stimulează producția de vitamine aparținând în general grupului B și determină creșterea activității lactozei și maltozei;

– proliferează în tractul digestiv și sunt în competiție cu bacteriile patogene.

9 BIOPROCESE AEROBE

9.1. OBȚINEREA PRIN BIOSINTEZĂ A ACIZILOR ORGANICI

Un număr mare de acizi organici se formează în procesul de degradare anaerobă a glucidelor şi al oxidării incomplete a acestora. Plecând de la aceste observaţii, s-au studiat posibilităţile de obţinere la scară industrială, prin tehnologii biochimice, a acizilor carboxilici, a hidroxiacizilor, aminoacizilor. În prezent, tehnologiile biochimice sunt utilizate pe scară largă pentru obţinerea de acizi organici.

Astfel, se obţin industrial acizi mono- şi policarboxilici (acid acetic, acid propionic, acid itaconic), acizi monohidroxi-monocarboxilici (acid lactic), acizi monohidroxi-policarboxilici (acid citric) şi acizi polihidroxi-monocarboxilici (acid gluconic).

În procesul de biosinteză se folosesc medii de cultură conţinând melasă, amidon, maltoză, glucoză, surse de azot, săruri minerale, pe care se cultivă microorganisme din clasa bacteriilor şi fungilor, producătoare de acizi carboxilici. Astfel, cultivând microorganismul *Aspergillus niger* pe un mediu cu melasă, s-au obţinut o serie de acizi carboxilici al căror conţinut este determinat de compoziţia chimică a mediului de cultură şi de durata fermentaţiei (fig.9.1)

Pentru dirijarea procesului de fermentaţie spre un anumit acid se folosesc microorganisme specifice, cultivate pe un mediu adecvat.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

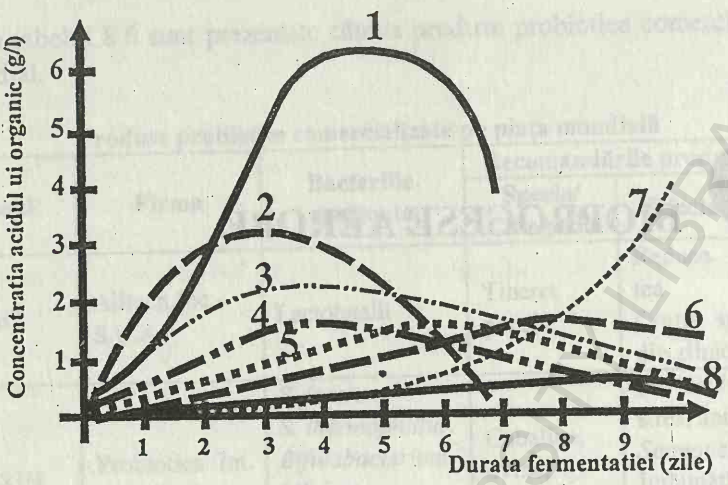


Fig.9.1. Biosinteza acizilor organici cu *Aspergillus niger*:
1 – acid malonic; *2* – acid succinic; *3* – acid malic; *4* – acid zaharic; *5* – acid gluconic; *6* – acid aconitic; *7* – acid oxalic; *8* – acid fumaric.

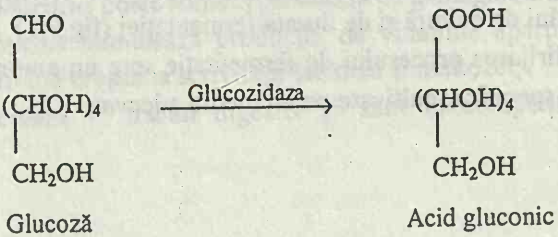
9.1.1. Tehnologia acidului gluconic

Acidul gluconic se utilizează în industria farmaceutică pentru prepararea gluconatului de calciu, medicament utilizat în tratamentul rahitismului, al hipocalcemiei, al spasmofiliei.

Acidul gluconic se poate obţine prin oxidarea glucozei pe cale chimică, electrochimică sau biochimică. Prin metoda chimică se folosesc ca agenţi de oxidare: apă de clor, apă oxigenată, nu se obţine un produs pur, întrucât molecula de glucoză se rupe nespecific, rezultând un amestec de acizi organici.

Prin metoda electrochimică se foloseşte oxigenul rezultat în urma electrolizei apei şi procedeul este foarte scump datorită consumului de energie electrică; oxidarea este, de asemenea, nespecifică.

Procedeul biochimic de oxidare a glucozei (fig.9.2) este cel mai comod şi ieftin de obţinere a acestui produs. În plus, reacţia este specifică, fiind realizată de enzima glucozoxidază. Din reacţie nu rezultă produşi secundari.



Pentru oxidarea biochimică a glucozei la acid gluconic au fost descrise procedee de fermentație de suprafață, care durează 11–12 zile și au loc cu randamente mici, de 70–80%. Cu timpul, aceste procedee au fost înlocuite cu procedee de fermentație în profunzime (adică procedee submerse), care utilizează microorganisme din genul *Aspergillus*.

În mediul de cultură, conținând 20–30% glucoză, sursa de azot organic (extract de porumb), uree, substanțe minerale ($MgSO_4 \cdot 7\,H_20$, KH_2PO_4, $NH_4H_2PO_4$) se cultivă microorganisme din clasa fungilor, de obicei *Aspergillus niger*, la temperaturi între 25 și 28°C și la un *p*H de 6,5.

Pe parcursul fermentației, *p*H-ul se corectează cu soluție de NaOH 40%, dacă se dorește obținerea gluconatului de sodiu sau cu $Ca(OH)_2$, dacă se intenționează obținerea gluconatului de calciu.

$$2CH_2OH-(CHOH)_4-COOH+Ca(OH)_2 \rightarrow$$
$$\rightarrow (CH_2OH-(CHOH)_4-COO)_2Ca+2H_2O$$

$$2CH_2OH(CHOH)_4-COOH+NaOH \rightarrow CH_2OH(CHOH)_4-COONa+H_2O$$

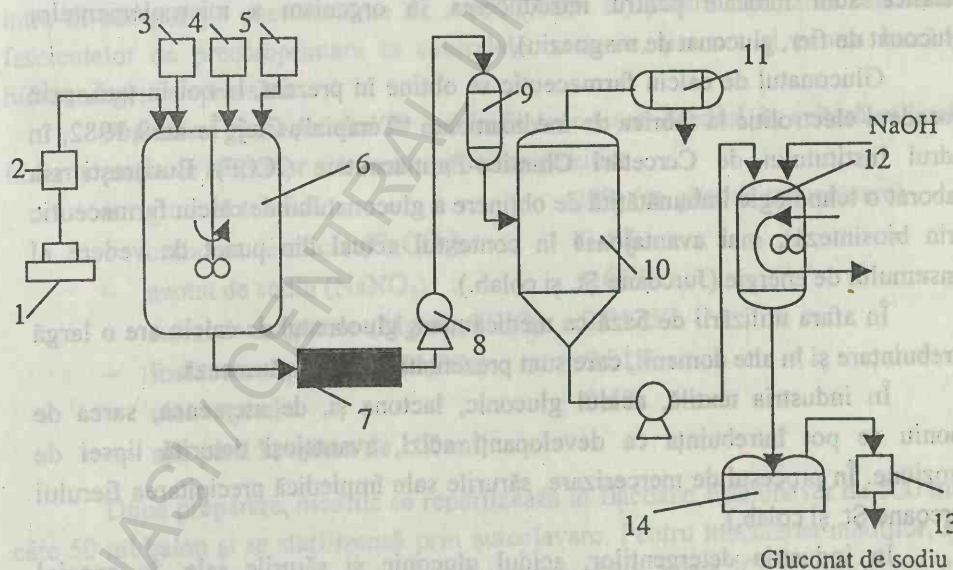


Fig. 9.2. Instalatie de producere a aciduiui gluconic prin biosinteză:
1 – compresor; *2* – filtru de aer; *3* – rezervor mediu de cultură; *4* – rezervor soluție NaOH; *5* – rezervor antispumant; *6* – fermentator; *7* – filtru-presă; *8* – pompă; *9* – rezervor; *10* – concentrator; *11* – condensator; *12* – reactor neautralizare; *13* – cristalizator; *14* – moară cu bile (După Oniscu, 1978).

FCUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După terminarea fermentației, mediul se filtrează pe filtrul-presă pentru separarea biomasei. Soluția obținută se concentrează în evaporatorul pelicular, după care este trimisă în aparatul de neutralizare cu NaOH sau $Ca(OH)_2$, iar de aici la cristalizare într-un cristalizator răcit cu solă la 2...3°C. Sarea acidului gluconic se purifică suplimentar prin recristalizare.

Pentru obținerea acidului gluconic s-au cercetat și posibilitățile utilizării bacteriilor. S-au pus la punct procedee de cultivare cu *Acetobacter oxydans* și *Acetobacter gluconicum*, astfel încât în prezent, la scară industrială, se folosesc atât procedeele de cultivare a fungilor, cât și cele de cultivare a bacteriilor.

9.1.1.1. Obținerea gluconatului de calciu cu tulpina *Aspergillus niger ICCF*

Sărurile acidului gluconic au o largă întrebuințare în farmacie, datorită toxicității reduse și capacității de a fi bine tolerate de organismul uman.

Gluconatul de calciu este astfel mult folosit ca atare sau sub formă de gluconolactat de calciu, în cazuri de deficiență de calciu. Diferite alte săruri metalice sunt indicate pentru introducerea în organism a microelementelor (gluconat de fier, gluconat de magneziu).

Gluconatul de calciu farmaceutic se obține în prezent, la noi în țară, prin procedeul electrolitic la fabrica de medicamente "Terapia", Cluj. În anul 1982, în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice (ICCF) București s-a elaborat o tehnologie îmbunătățită de obținere a gluconatului de calciu farmaceutic (prin biosinteză), mai avantajoasă în contextul actual din punct de vedere al consumului de energie (Jurcoane Șt. și colab.).

În afara utilizării de bază ca medicament, gluconatul de calciu are o largă întrebuințare și în alte domenii, care sunt prezentate în cele ce urmează.

În industria textilă, acidul gluconic, lactona și, de asemenea, sarea de amoniu se pot întrebuința ca developanți acizi, avantajoși datorită lipsei de coroziune. În procesul de mercerizare, sărurile sale împiedică precipitarea fierului (Jurcoane Șt. și colab.).

În industria detergenților, acidul gluconic și sărurile sale, în special gluconatul de calciu, găsesc un teren vast de aplicare, datorită proprietăților de a împiedica precipitarea calciului și a magneziului, în cazul folosirii apelor cu duritate mai mare. Sunt deosebit de utili în special în cazul spălării mecanizate, deoarece combat corodarea aparaturii.

În industria produselor lactate, acidul gluconic se poate întrebuința în instalațiile de spălare, pentru a împiedica precipitarea așa-zisei "pietre de lapte",

precum şi în industria berii, pentru a preveni formarea depozitelor instabile din instalaţie.

În industria pielăriei se poate întrebuinţa acidul gluconic în tăbăcirea cu fier şi aluminiu, deoarece sub formă de gluconaţi aceste metale nu precipită înainte de a atinge punctul izoelectric al pielii. Gluconatul de litiu se poate întrebuinţa ca material tanant în pregătirea pieii albe.

Un alt domeniu de utilizare este industria fotografică, unde este necesară împiedicarea precipitării developanţilor alcalini prin adaosuri de gluconaţi.

În industria alimentară se poate folosi pentru a întârzia râncezirea produselor ce conţin grăsimi. De asemenea, lactona se pretează foarte bine pentru prepararea prafurilor de copt, fiind superioară acidului tartric şi sărurilor sale, deoarece pune în libertate mai uniform dioxidul de carbon.

În zootehnie, gluconatul de calciu reprezintă o sursă adecvată de calciu pentru viţei, păsări etc.

În construcţii, sărurile acidului gluconic (de calciu şi sodiu), datorită proprietăţilor lor de întârziere a prizei cimentului, se utilizează la prepararea unor aditivi necesari în fabricarea cimenturilor speciale. Astfel, gluconatul de calciu intră în compoziţia unei variante de Adox (Adox R) pentru injectarea canalelor fasciculelor de precomprimare la centralele nucleare, precum şi pentru lucrări hidroenergetice speciale.

Obţinerea gluconatului de calciu în laborator. Mediul de cultură utilizat în fermentaţia de laborator are următoarea compoziţie:

- glucoză tehnică: 20% (ca glucide reducătoare)
- carbonat de calciu ($CaCO_3$): 3,4%
- azotat de sodiu ($NaNO_3$): 0,05%
- sulfat de magneziu ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$): 0,0125%
- fosfat monopotasic (KH_2PO_4): 0,01%
- ulei vegetal : 0,1%
- apă până la volum de 100 ml.

După preparare, mediile se repartizează în flacoane Erlenmayer de 500 ml, câte 50 ml/balon şi se sterilizează prin autoclavare. Pentru inocularea mediilor, se utilizează o suspensie de spori a tulpinii *Aspergillus niger* ICCF. Baloanele cu mediu însămânţate sunt incubate la termostat (35°C) pe agitatorul rotativ (turaţie – 220 rot/min).

Pentru urmărirea evoluţiei bioprocesului, se iau probe din 8 în 8 ore, la care se determină conţinutul în glucoză netransformată la timpul respectiv, precum şi cantitatea de gluconat de calciu formată.

Obținerea acidului gluconic în stații pilot. Compoziția mediului de cultură utilizat în experimentările pilot este cea indicată în paragraful anterior pentru experiențele de laborator.

Mediile se prepară dizolvând glucoza în apă caldă; cantitatea de apă utilizată în acest scop se calculează astfel încât să fie aproximativ jumătate din cantitatea totală necesară pentru pregătirea mediului de cultură. Sărurile se dizolvă fiecare separat, turnându-se soluțiile respective peste soluția de glucoză, se aduce mediul la volumul de 50 litri, apoi se introduce în fermentatorul de 90 litri; se adaugă ulei vegetal ca antispumant și se sterilizează timp de 30 min la 110°C.

După răcire, se adaugă suspensia de carbonat de calciu și se însămânțează cu 10% inocul vegetativ pregătit în laborator; se stabilesc următorii parametri de lucru:

- presiunea în bioreactor: 2 bar;
- debitul de aer: 0,7 l aer/1 mediu/min;
- turația agitatorului: 280 rot/min;
- temperatura: 35°C.

Pentru urmărirea procesului și a dinamicii de oxidare biochimică a glucozei cu tulpina *Aspergillus niger* ICCF, se iau probe de mediu din 8 în 8 ore, în care se determină: concentrația glucozei, *p*H-ul mediului, concentrația în gluconat de calciu, aspectul microorganismului. Dacă *p*H-ul mediului scade sub valoarea 5, se adaugă o suspensie de carbonat de calciu sterilizată, pentru corecție, până la valoarea 6,5.

După 30–40 ore concentrația glucozei scade sub 0,5%, aproximativ 94% din cantitatea de glucoză fiind transformată în gluconat de calciu, a cărei concentratie devine 9–10%.

În vederea izolării gluconatului de calciu, mediul de cultură se filtrează, în scopul separării biomasei, după care soluția nativă se concentrează până la 20–30 % gluconat si apoi se supune operației de cristalizare, prin răcire la 4...5°C, sub agitare continuă.

O altă variantă de recuperare a gluconatului de calciu din mediul de cultură este uscarea prin atomizare; se obține un produs tehnic, din care ulterior se pot obține, prin purificare, diferite calități de gluconat de calciu (fig. 9.3). Produsul de puritate 99%, comercializat sub denumirea "calciu gluconic", se obține prin decolorare cu cărbune activ, cristalizare și recristalizare în alcool etilic a soluției perfect limpezi rezultate în urma filtrării biomasei din mediul de fermentație.

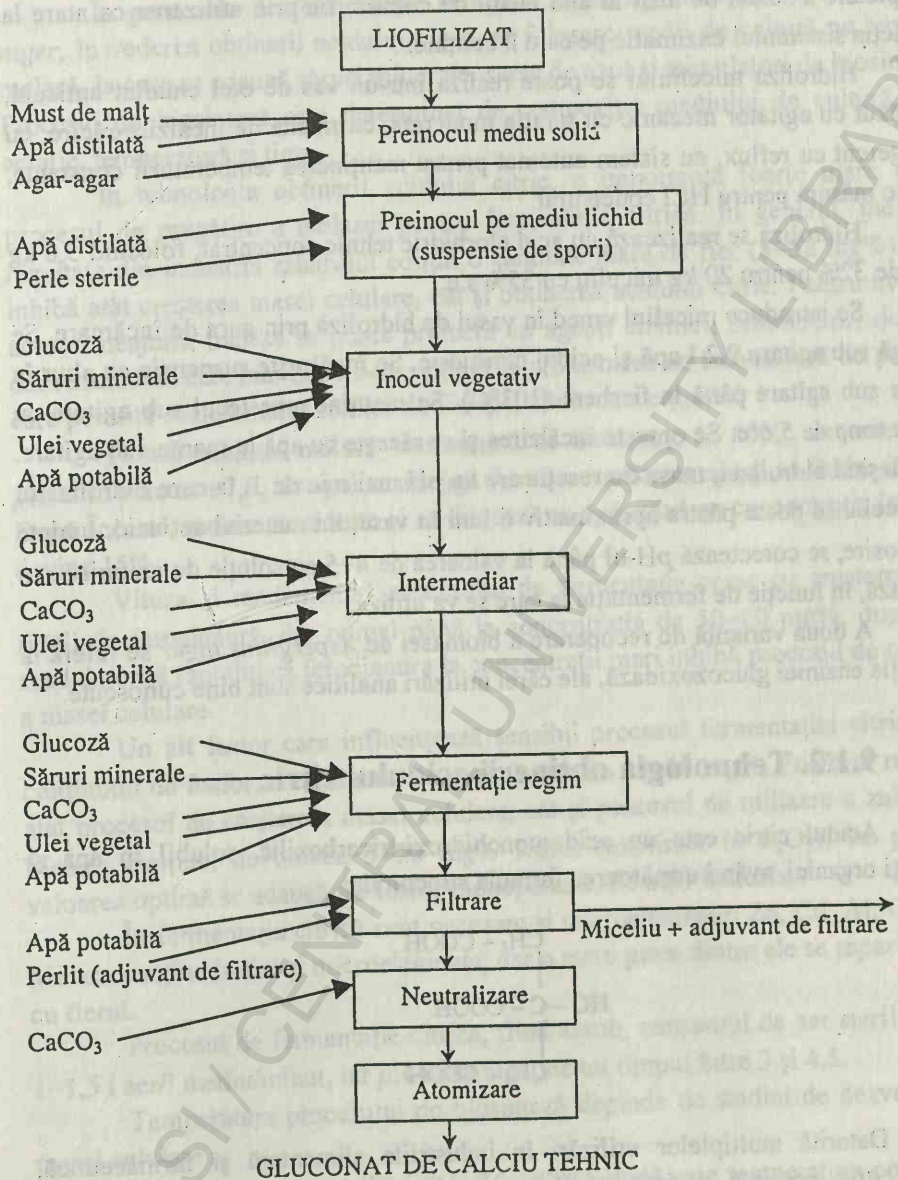


Fig. 9.3. Schema operaţiilor principale şi a fluxurilor de materiale în procesul de obţinere a gluconatului de calciu tehnic.

Recuperări şi deşeuri. Din procesul de obţinere a gluconatului de calciu tehnic prin biosinteză rezultă, la faza de filtrare a mediului de cultură, un miceliu de *Aspergillus niger*, cu aproximativ 40% substanţă uscată; acesta poate fi recuperat fie prin transformarea sa în hidrolizat de miceliu şi folosit ca o

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

completare a sursei de azot în alte medii de cultură, fie prin utilizarea ca atare la extracția sistemului enzimatic pe care îl conține.

Hidroliza miceliului se poate realiza într-un vas de oțel emailat antiacid, prevăzut cu agitator mecanic cu turația moderată, cu manta de încălzire-răcire, cu refrigerent cu reflux, cu sistem automat pentru menținerea temperaturii constante, vas de măsură pentru HCl concentrat.

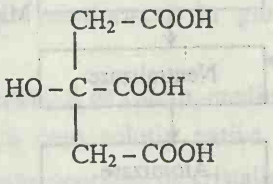
Hidroliza se realizează cu acid clorhidric tehnic concentrat, folosind 5,0 kg HCl de 32% pentru 20 kg miceliu cu 35% s.u.

Se introduce miceliul umed în vasul de hidroliză prin gura de încărcare. Se adaugă sub agitare 9,2 l apă și acidul clorhidric. Se încălzește suspensia cu abur în manta sub agitare până la fierbere (103°C). Se menține amestecul sub agitare cu reflux timp de 5 ore. Se oprește încălzirea și se răcește cu apă în manta sub agitare. La sfârșitul hidrolizei, masa de reacție are un *p*H mai mic de 1, la care hidrolizatul de miceliu se poate păstra aproximativ 6 luni în vase din material antiacid. Înainte de folosire, se corectează *p*H-ul până la valoarea de 4–5 cu soluție de amoniac sau altă bază, în funcție de fermentația la care se va utiliza.

A doua variantă de recuperare a biomasei de *Aspergillus niger* se referă la extracția enzimei glucozoxidază, ale cărei utilizări analitice sunt bine cunoscute.

9.1.2. Tehnologia obținerii acidului citric

Acidul citric este un acid monohidroxi-tricarboxilic, solubil în apă și solvenți organici, având următoarea formulă structurală:



Datorită multiplelor utilizări în industriile alimentară și farmaceutică, acidul citric prezintă o importanță economică deosebită. Au fost cercetate tehnologii prin biosinteză cu *Aspergillus niger*, *Aspergillus clavatus*, *Penicillium luteum*, *Penicillium citrinum*, dar aplicații industriale și-au găsit numai tehnologiile ce folosesc culturi de *Aspergillus niger*, dintre mediile studiate (cu melasă, glucoză, zahăr), cel mai eficient s-a dovedit mediul de cultură pe bază de melasă.

În ceea ce privește mecanismul de biosinteză a acidului citric, prezența în biomasă a acizilor aconitic, succinic, malic și fumaric demonstrează că acidul citric se formează ca rezultat al reacțiilor ciclului acizilor tricarboxilici.

În procesele de fermentație aerobă a microorganismelor de *Aspergillus niger*, în vederea obținerii acidului citric, se folosesc medii de cultură pe bază de melasă, la care se adaugă săruri minerale, surse de azot și stimulatori de biosinteză. Procesul de biosinteză este determinat de compoziția mediului de cultură, *p*H, aerație, temperatură și timp.

În tehnologia obținerii acidului citric, o importanță foarte mare o are procesul de pregătire a melasei pentru fermentația citrică. În general, melasele rezultate din industria zahărului conțin o cantitate mare de fier (8–52 mg%), care inhibă atât creșterea masei celulare, cât și obținerea acidului citric. Pentru evitarea acestui neajuns, melasa se poate prelucra cu agenți chimici, schimbători de ioni, dar rezultatele cele mai bune s-au obținut la prelucrarea cu ferocianură de potasiu, care permite sedimentarea ionilor de fier și a altor metale grele.

Pentru aceasta, melasa concentrată se încălzește la 40°C, se corectează *p*H-ul la valoarea 7,0, iar apoi se adaugă ferocianura de potasiu și se fierbe 45 min. După aceasta, melasa se răcește și se diluează cu apă, până ce concentrația în zahăr devine 15%.

Viteza și randamentul procesului de fermentație cresc cu creșterea cantității de ferocianură, dar numai până la concentrația de 50–60 mg%, după care scad datorită faptului că ferocianura la concentrații mari inhibă procesul de creștere a masei celulare.

Un alt factor care influențează sensibil procesul fermentației citrice este conținutul de fosfor, a cărui valoare optimă este de 25–30 mg%. Fosforul reglează atât procesul de creștere a masei celulare, cât și procesul de utilizare a zahărului. Melasa conține, de obicei, 3–20 mg% fosfor (exprimat în P_2O_5), iar până la valoarea optimă se adaugă fie fosfor monopotasic, fie acid fosforic.

În fermentația citrică sunt necesare și microelemente: Zn, Cd, Al, Cu, Mg. Melasa conține inițial și microelemente, dar o mare parte dintre ele se separă o dată cu fierul.

Procesul de fermentație citrică, fiind aerob, consumul de aer steril este de 1–1,5 l aer/l mediu/minut, iar *p*H-ul se menține tot timpul între 3 și 4,5.

Temperatura procesului de biosinteză depinde de stadiul de dezvoltare al masei celulare.

Însămânțarea se realizează la 36...42°C, după care temperatura coboară la 34...36°C și se menține la această valoare timp de 24–36 ore, cât durează dezvoltarea masei microbiene, apoi temperatura se scade la 30...32°C și se menține la această valoare pe toată durata elaborării acidului citric.

Studiind dinamica procesului de biosinteză a acidului citric, rezultă că acumularea sa începe după 25–30 ore de fermentație, iar viteza maximă de acumulare se atinge în zilele a 5-a și a 6-a. Din cantitatea totală de sursă de carbon,

10–15% se foloseşte pentru dezvoltarea biomasei. În final, se obţine un amestec de acizi organici, în care acidul citric reprezintă 80–95%.

Din punct de vedere tehnologic, procesul de fermentaţie a acidului citric cu *Aspergillus niger* poate fi realizat la suprafaţă sau în profunzime.

În primul sistem fermentaţia durează 10–11 zile, iar în al doilea 6–7 zile.

După terminarea fazei de fermentaţie şi filtrarea miceliului, soluţia apoasă se supune prelucrării pentru separarea acidului citric cristalin.

Separarea acidului citric sub formă de cristale se bazează pe proprietatea unor săruri ale sale (sare de calciu) de a nu se dizolva în apă şi se realizează în următoarele etape:

– precipitarea acidului citric sub formă de sare de calciu şi filtrarea acestuia;
– tratarea cu acid sulfuric şi separarea sulfatului de calciu precipitat;
– decolorarea cu cărbune activ, demineralizarea şi concentrarea soluţiei de acid citric;
– cristalizarea şi filtrarea;
– uscarea (în strat fluidizat).

Din procesul de obţinere a acidului citric rezultă soluţii apoase (conţinând zahăr, aminoacizi, acizi carboxilici) şi miceliu. Soluţiile apoase pot fi utilizate ca medii de cultură pentru biostimulatori, iar miceliul uscat poate fi utilizat ca adaos în hrana păsărilor, având un efect stimulator în procesul de creştere.

9.2. BIOSINTEZA AMINOACIZILOR

Pentru menţinerea funcţiilor metabolice în organism şi formarea proteinelor, aminoacizii esenţiali trebuie introduşi continuu în organism prin intermediul alimentelor. Alimentele nu au aceeaşi valoare biologică din punct de vedere al conţinutului în aminoacizi esenţiali.

În general, produsele din regnul animal (ouă, lapte, carne, peşte) au o valoare biologică mai mare decât cele din regnul vegetal (cereale, legume) care conţin o proporţie mai mică de aminoacizi esenţiali. În special, cerealele se remarcă prin lipsă de lizină şi exces de leucină.

Deoarece producţia animală este mai scăzută decât cea agricolă, în unele regiuni ale lumii se observă o stare de subnutriţie continuă a populaţiei. Remedierea acestei situaţii se poate face fie direct prin folosirea în alimentaţia omului a unui amestec de proteine naturale (cereale cu lapte etc.) sau prin administrarea unuia sau mai multor aminoacizi esenţiali, fie indirect prin completarea valorii nutritive a nutreţurilor vitelor, păsărilor şi porcilor. În acest

ultim caz se obține o creștere apreciabilă a producției de animale, dacă nutreturile sunt suplimentate cu adaosuri proteice de diferite proveniențe bogate în lizină ca: făina de pește, drojdia furajeră etc., precum și cu preparate de aminoacizi esențiali.

Adaosul de lizină și metionină în nutreturi ridică valoarea nutritivă a furajelor la nivelul proteinelor animale.

Având în vedere cererea masivă în acest aminoacid, pe plan mondial s-a dezvoltat industria fermentativă care produce prin biosinteză lizina.

9.2.1. Biosinteza L-lizinei

9.2.1.1. Microorganisme producătoare de L-lizină

În 1956, în laboratorul din Kinoshita a fost izolat un microorganism capabil să producă glutamat într-un mediu care conținea glucoză și ioni de amoniu. Acest microorganism, denumit *Micrococcus glutamicus*, prezintă **caracteristici comune** genurilor *Corynebacterium* și *Brevibacterium*: bacterii în formă de bacili scurți sau coloidali Gram-pozitivi, nesporulați, imobili, aerobi; necesită biotină ca factor esențial de creștere; forma celulelor este adesea variabilă, în funcție de compoziția mediului de cultură; unul din factorii principali, care afectează forma celulelor, este concentrația de biotină din mediu; colonii gălbui; conținut în *G+C* de 53–55% în ADN; crește la 30°C.

Prin aceste caractere, *Micrococcus glutamicus* se încadrează în genul *Corynebacterium*, astfel încât denumirea actualmente admisă este de *Corynebacterium glutamicum* (*C.glutamicum*).

În mai puțin de un deceniu s-au descoperit și alte microorganisme producătoare de acid glutamic. Pentru clasificarea și identificarea acestor microorganisme, chemotaxonomia este un important instrument.

Keddie și colaboratorii (1978, 1980) au clasificat bacteriile corineforme în 13 grupe și a definit genul *Corynebacterium* ca fiind format din bacterii care conțin acid meso-diaminopimelic, arabinoză, galactoză, acid micolic în peretele celular și menaquinone majore MK – 8 ori MK – 9 și 51–59 % *G + C* în ADN.

Această definiție este aproape comparabilă cu taxonul produs de Yamada și Komagata pentru bacteriile ce aparțin grupului 1 al bacteriilor corineforme.

Aproape toate bacteriile producătoare de acid glutamic pot fi grupate în taxonul *Corynebacterium* propus de Keddie și colaboratorii.

Komatsu și Kaneko (1980) au raportat omologia ADN la unele bacterii producătoare de acid glutamic. Alte studii au demonstrat că *C.glutamicum* ATCC 13032, *C.lilium* ATCC 15990, *Brevibacterium flavum* (*B.flavum*) ATCC 14067 și *B.divaricatum* ATCC 14020 pot fi grupate în același cluster de omologie a ADN-

ului, care este diferit de cel al lui *B.ammoniagenes* ATCC 6872, *Microbacterium flavum* şi *C.diphteriae* ATCC 11913.

Luând în considerare toate constatările taxonomiei convenţionale, chemotaxonomiei şi omologiei ADN-ului, se consideră că bacteriile producătoare de acid glutamic reprezintă o singură specie ce aparţine genului *Corynebacterium*.

Tulpinile de tip sălbatic, producătoare de acid glutamic, au fost izolate din natură după capacitatea de a produce acid glutamic şi apoi prin inducere cu factori mutageni s-a obţinut o serie întreagă de mutante producătoare de diverşi aminoacizi, printre care şi L-lizina.

Tulpina folosită pentru obţinerea de mutante producătoare de L-lizină poate aparţine următoarelor genuri: *Micrococcus, Brevibacterium, Microbacterium, Corynebacterium* etc.

Mutantele care au un nivel ridicat de biosinteză a L-lizinei aparţin următoarelor **clase:**

– mutante auxotrofe, dependente de homoserină sau metionină + treonină, metionină + homocisteină, treonină + cistationină sau treonină;

– mutante duble care, în afara auxotrofiei indicate mai sus, sunt auxotrofe în plus faţă de leucină, histidină sau izoleucină + valină;

– mutante reglatoare, rezistente la analogi ai lizinei S-2 aminoetilcisteină, ai treoninei acidul α-amino-β-hidroxivalerianic sau ai izoleucinei, acidul α-aminobutiric etc.;

– mutante "leaky", la care activitatea genei mutante nu este complet alterată, putând fi exprimată fenotipic parţial;

– mutante auxotrofe şi rezistente la antibiotice.

Pentru biosinteza lizinei se folosesc şi alte organisme precum: *Arthrobacter citrus, Trichospora cutaneum, Hycobacterium tuberculosis* ATCC 15073, *Streptomyces coronoformis* ATCC 15074.

9.2.1.2. Mutanţii şi recombinarea genetică la bacteriile corineforme

Mutante biochimice. Succesul în producţia industrială a acidului glutamic a stimulat interesul pentru descoperirea mutantelor producătoare de alţi aminoacizi.

Tulpinile de tip sălbatic producătoare de acid glutamic sunt capabile să sintetizeze numai câţiva aminoacizi, precum acidul glutamic, valină, prolină, glutamine şi alanine.

Pentru reducerea extracelulară a unui aminoacid dorit sunt necesare modificări ale metabolismului celular şi ale mecanismului de control al acestuia. Astfel, s-au făcut încercări pentru a induce mutante auxotrofe şi mutante reglatoare.

Avantajul folosirii mutantelor auxotrofe constă în acela că ele elimină ramificația care nu prezintă interes, favorizând în acest mod acumularea în mediu numai a aminoacidului care interesează.

Mutantele reglatoare sunt mutante care și-au pierdut o anumită cale de reglare biochimică. Ele sunt de două categorii:

– rezistente la un analog al aminoacidului respectiv;

– revertante ale mutantelor auxotrofe, care sunt deficiente pentru o anumită enzimă reglatoare.

Cei mai mulți aminoacizi sunt produși astăzi folosind mutante care conțin combinații ale mutațiilor auxotrofe și reglatorii.

Tulpinile înalt producătoare au fost obținute prin eliminarea abilității organismului de a degrada produsul final și îmbunătățirea permeabilității celulei în favoarea excreției produsului.

Inițial, s-au obținut mutante producătoare de L-lizină, folosind ca tulpini parentale producătoarele de acid glutamic, cu ajutorul radiațiilor UV, X și Γ.

Mutantele obținute cu ajutorul radiațiilor UV. Acțiunea primară a radiațiilor UV se exercită asupra bazelor azotate pirimidinice (adenină și timină), având drept efecte hidratarea bazelor azotate și formarea dimerilor pirimidinici.

În lucrările de mutageneză din țara noastră cu tulpina *B.lactofermentum* ATCC 13869, radiațiile UV au indus, însă, un procent scăzut de mutante auxotrofe și anume **0,38%**.

Doza inductoare de mutante auxotrofe producătoare de L-lizină a fost pentru *B.lactofermentum* ATCC 13869 de 48 x 10^3 ergi/cm^2, care a indus o letalitate de 99,9%.

Rezultatele obținute confirmă datele din literatură care susțin că pentru obținerea de mutante se folosesc dozele cele mai mari care au ca efect letalități exponențiale, înainte de a se instala rezistența microorganismelor față de radiațiile UV.

Mutantele obținute cu ajutorul radiațiilor gama. La tulpina *C.melassecola* ATCC 17965, radiațiile gama au indus mutante auxotrofe cu o frecvență foarte apropiată de cea a radiațiilor UV și anume **0,4%**. Dozele inductoare au fost de 20–25 kr. Aceste doze provoacă letalități care se găsesc pe curba exponențială, imediat după faza inițială de *lag* și care corespund unor letalități de 70–80%.

Recent, mutageni chimici precum **N – metil – N' – nitro – N – nitrozo – guanidină (NTG)** au fost utilizați în locul mutagenilor fizici de mai sus, datorită frecvențelor mai înalte ale mutațiilor și tratamentelor mai simple.

NTG este un agent alchilant care produce alchilarea bazelor azotate din acizii nucleici: N_7 – guanina, N_1 – și N_3 – adenina, N_1 – citozina și N_1 – timina.

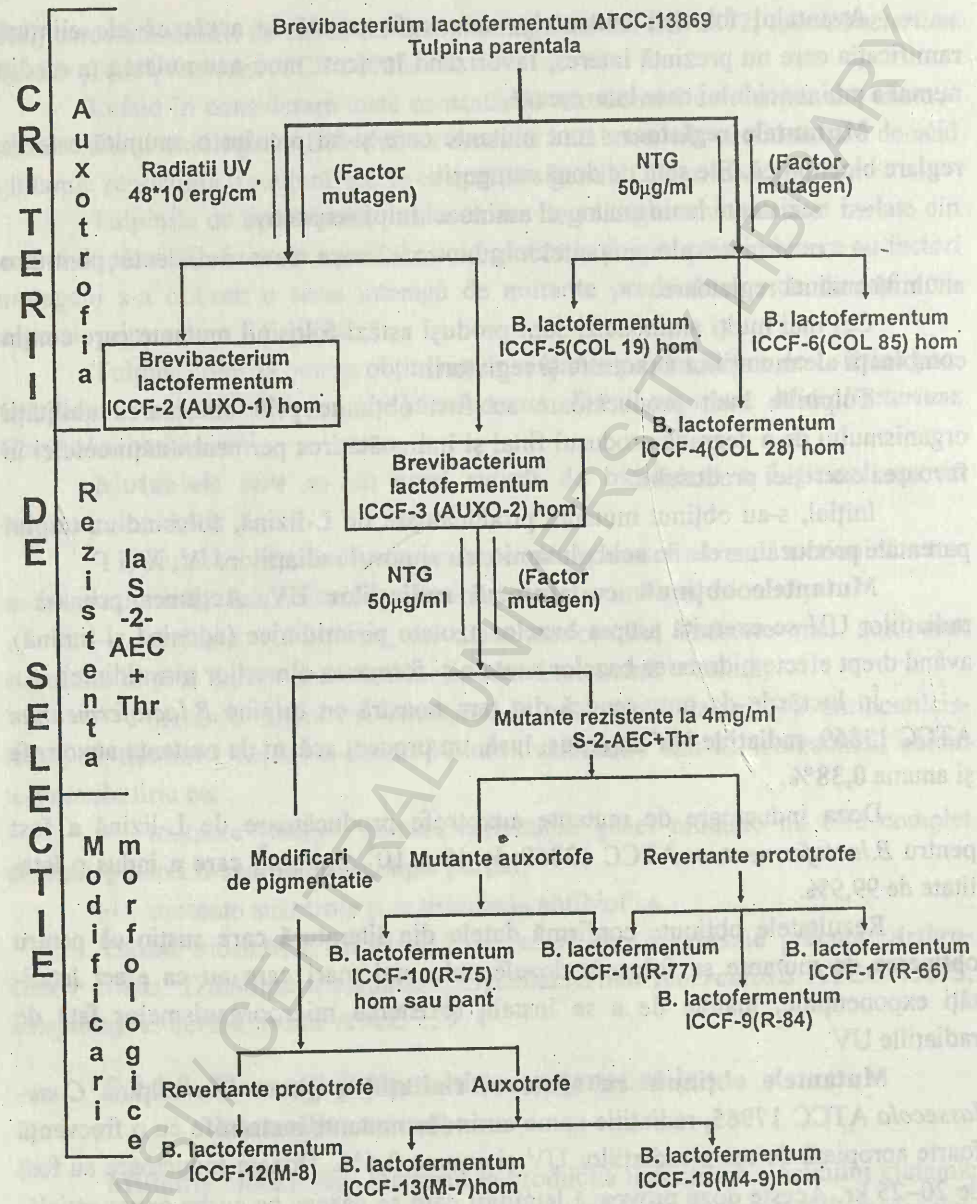


Fig.9.4. Genealogia mutantelor din genul *Brevibacterium* producătoare de L-lizină (Săsărman E.,1979).

La *B.lactofermentum* ATCC 13869, la o concentrație de 50 µg/ml și 2 h de expunere, s-a obținut un procent maxim de 34,9% mutante auxotrofe. Concentrația eficace s-a dovedit aceea care se înscrie pe prima parte a curbei exponențiale, ceea

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ce corespunde unei letalităţi de 44,9% pentru *B.lactofermentum* ATCC 13869 şi 85,8% pentru *B.lactofermentum* ICCF. Analiza dozelor mutagene eficace la tulpinile parentale studiate sugerează ideea că pentru obţinerea de mutante auxotrofe producătoare de L-lizină sunt necesare doze relativ mici. Aceasta s-ar putea explica prin faptul că mutaţia este punctiformă, afectează o singură genă sau un grup restrâns de gene structurale şi reglatoare implicate în biosinteza L-lizinei.

Din totalitatea mutantelor izolate, numai mutantele dependente de homoserină, iar dintre acestea numai o parte, au acumulat cantităţi apreciabile de L-lizină. Această caracteristică s-ar datora selectivităţii mediului de fermentaţie pe care s-a realizat biosinteza. De aici rezultă că ultima treaptă de selecţie este determinată de componenta chimică a mediului de fermentaţie folosit (fig 9.4).

Recombinarea genetică la bacteriile corineforme. Fagii temperaţi şi transducţia. Dintre metodele de recombinare genetică la bacterii, fuziunea celulară mediată de factorul F, transducţia fagică şi transformarea ADN-ului sunt cele mai cunoscute. Se cunosc numai câteva cazuri de aplicare a acestor metode în scopuri industriale.

Recent, s-a raportat obţinerea unor tulpini de *Serratia marcescens* producătoare de arginină, histidină, izoleucină ori treonină cu ajutorului fagului temperat PS-20, care a fost utilizat pentru transducţia câtorva caractere legate de necesităţile nutriţionale şi reglarea metabolică.

Într-un studiu asupra bacteriilor producătoare de acid glutamic aparţinând genurilor *Corynebacterium* ori *Brevibacterium*, nu s-a obţinut transducţia caracterelor auxotrofe cu ajutorul fagilor temperaţi.

În alte studii, fagul temperat CP-119 a fost capabil să transducă caractere auxotrofe la *Brevibacterium sp.* cu o frecvenţă de 10^{-7}.

Recent, au fost izolate 4 tipuri de fagi temperaţi de la *C.glutamicum*. Fiecare fag avea un cap poliedric şi o coadă cu o teacă contractilă. Ei au fost clasificaţi în 2 grupe moleculare: 10–11 x 10^6 Da şi 25–26 x 10^6 Da.

Se investighează încă utilizarea acestor fagi în transducţie.

Fuziunea celulară. Fuziunea celulară a devenit o metodă promiţătoare pentru obţinerea producătorilor de aminoacizi. Metoda depinde, în principal, de tratarea celulelor cu lizozim în condiţii izotonice, după cultivarea lor cu o concentraţie scăzută de penicilină. În acest mod se obţin protoplaşti. În ceea ce priveşte efectele stării fiziologice a celulelor asupra caracteristicilor protoplaştilor, sunt cunoscute puţine date. Baltz a raportat existenţa unei etape de "tranziţie" critică între creşterea exponenţială şi cea staţionară pentru prepararea protoplaştilor la bacteriile Gram (+) (*Streptomyces fradiae* şi *S. griseofuscus*), care ar putea fi răspunzătoare de o bună regenerare a protoplaştilor. S-a observat că protoplaştii obţinuţi din micelii foarte vechi au o viabilitate mai redusă.

Există mai multe posibilităţi de a se induce fuziunea într-o populaţie microbiană de protoplaşti.

Primele cercetări se referă la fuziunea microbiană în prezenţa virusurilor inactivate. Sistemul cel mai eficient şi frecvent aplicat constă în folosirea *polietilenglicolului* (*PEG*) cu greutate moleculară ridicată şi în prezenţa ionilor de calciu.

Acest excelent agent de dehidratare folosit pentru prima dată în studiile referitoare la protoplaştii bacterieni ca stabilizator a fost introdus mai târziu ca agent de fuziune. PEG-ul a fost larg folosit ca precipitant pentru o mare varietate de macrostructuri incluzând bacterii, virusuri, proteine, ADN. Probabil că PEG-ul induce precipitarea prin modificarea structurii apei, excluzându-se posibilitatea hidratării stratului din jurul particulelor sau moleculelor. Se recomandă fie concentraţii mici de PEG cu greutate moleculară mare (PEG 6000 sol. 1%), fie concentraţii mari la greutăţi moleculare mici (50–60% PEG 1000). În general, recomandările bibliografice se referă la folosirea de PEG cu greutate mică pentru procariote. Totuşi, în practică, se foloseşte PEG 6000–8000 pentru procariote.

PEG-ul purificat nu prezintă caracteristici fuzogene şi activitatea fuzogenă este asociată cu o substanţă care impurifică PEG-ul, probabil un antioxidant. Adăugarea unor antioxidanţi la PEG-ul purificat restaurează parţial sau complet activitatea fuzogenă. Deşi complexul de fuziune PEG Ca^{2+} are o serie de avantaje sub raportul eficienţei ridicate şi a accesibilităţii, metoda prezintă următoarele *dezavantaje*:

– condiţii fiziologice necorespunzătoare ca valori de *p*H extreme (prea ridicate sau prea scăzute) şi concentraţie ridicată de calciu care afectează viabilitatea celulelor fuzionate;

– imposibilitatea observării microscopice a recombinanţilor doriţi în scopul izolării lor;

– fuziune asincronă cu formare de agregate heterogene cu număr variabil de protoplaşti;

– acţiunea necontrolată a agenţilor fuzogeni chimici asupra membranei celulare, afectând viabilitatea celulară;

– frecvenţa scăzută a recombinanţilor.

Realizări deosebite s-au obţinut în domeniul hidratării celulare prin *metoda electrofuziunii.*

Prin această metodă, celulele sunt supuse unui impuls electric de durată scurtă şi intensitate ridicată. Curentul induce o rupere reversibilă în zona de contact membrană-membrană, conducând la fuziune celulară. Ca urmare, creşte permeabilitatea celulară, permiţând transferul de material genetic şi citoplasmatic.

În general, fuziunea se realizează în condiţiile de *p*H şi temperatură stabilite pentru menţinerea protoplaştilor în mediul hipertonic.

S-a constatat că adaosul de EDTA şi K_2HPO_4 stimulează fuziunea, obţinându-se în condiţii optime o frecvenţă de fuziune de 5×10^{-6}.

În procesul de fuziune, ambii parentali participă atât prin componentele citoplasmatice, cât şi prin cele cromozomale. În condiţii fiziologice determinate, participarea celor 2 genitori la formarea recombinanţilor variază în limite foarte mari. Astfel, după studiile efectuate pe model experimental *Bacillus subtilis*, se pot obţine recombinanţi cu participare egală a celor doi genitori.

Tehnica fuziunii de protoplaşti deschide noi perspective teoretice de studiu, dar, mai ales, noi căi de abordare practică prin obţinerea de recombinanţi utili pentru biosinteză.

Fuziunea de protoplaşti se referă la existenţa a două microorganisme caracterizate genetic şi care pot fi urmărite sub raportul contribuţiei lor la formarea "hibridului" prin aşa-numiţii "markeri genetici".

De exemplu, protoplaştii de la două tulpini de *C.glutamicum* care aveau caractere auxotrofe diferite şi erau rezistente la streptomicină ori rifampicină au fuzionat, obţinându-se linii recombinante cu o frecvenţă de $10^{-6} - 10^{-7}$ per protoplaşti folosiţi, care erau rezistenţi la ambele antibiotice.

Caracterele auxotrofe ale unora dintre fuzanţi erau diferite de cele ale liniilor parentale, ceea ce dovedeşte că aceştia erau recombinanţi.

Una din tulpinile folosite – KY 9182 – era rezistentă la streptomicină şi necesita fenilalanină, iar altă tulpină – KY 9684 – era rezistentă la rifampicină şi necesita homoserină şi leucină. Tulpinile cu rezistenţă dublă la streptomicină şi rifampicină erau recombinante.

Ulterior dezvoltării acestui sistem de recombinare, este de aşteptat ca metoda fuziunii protoplaştilor să permită obţinerea a numeroşi recombinanţi, utili pentru producerea aminoacizilor.

Manipularea genetică. Recent, tehnologia ADN recombinant a fost folosită, pe scară largă, pentru producerea unor polipeptide valoroase din punct de vedere medical.

O serie de gene au fost clonate şi exprimate în *E. coli* cu ajutorul vectorilor plasmidiali.

Se speră ca asemenea experimente de manipulare genetică să fie aplicate şi pentru îmbunătăţirea producerii de aminoacizi.

Debabov şi colaboratorii (1982) şi Miwa şi colaboratorii (1981) au raportat obţinerea unei tulpini bacteriene cu producţie semnificativ crescută de treonină; un operon al treoninei a fost introdus în *E. coli* K-12 prin transformare cu o plasmidă hibridă construită din p BR 322. În condiţii optime, treonina a fost sintetizată într-o cantitate mai mare decât în tulpinile iniţiale.

Tehnologia ADN recombinant este utilă şi pentru ameliorarea tulpinilor producătoare de lizină. În acest scop, este importantă cunoaşterea geneticii moleculare a bacteriilor respective.

Deşi operonul triptofanului este primul la care s-a deschis mecanismul de reglaj al exprimării genice prin *atenuare transcripţională*, s-a constatat că şi operonii implicaţi în biosinteza altor aminoacizi, printre care şi lizina, manifestă acest fenomen.

Astfel, în cazul operonului triptofanului, când în celulă există suficient triptofan, ribozomii traduc regiunea iniţială a ARN*m* transcris din prima genă a operonului *Trp* (această zonă este bogată în codoni UGG ce codifică triptofan). Ca urmare, ribozomii se deplasează în această regiune a ARN*m* cu viteze diferite, funcţie de concentraţia citoplasmatică a triptofanului (*Trp*).

Funcţie de viteza de deplasare a ribozomilor, ARN*m* din această zonă poate lua două conformaţii sterice, dintre care una generează o structură "hair-pin", denumită atenuator şi care funcţionează ca un terminator *rho* – independent, blocând avansarea ARN polimerazei. Ca urmare, este oprit procesul de transcriere (transcriere abortivă) a întregului operon.

Eforturi recente au făcut posibilă izolarea câtorva plasmide de la bacteriile corineforme.

Au fost construite plasmide recombinante ce pot fi folosite ca *vectori shuttle* între *E.coli* şi bacterii corineforme. Un asemenea exemplu este plasmida *p* NAR_4, care a fost construită pornind de la plasmide *p* NAT 65 (de la corineforme) şi plasmida *p* ACY 177 (de la *E.coli*). În urma unor experienţe de transformare a unor tulpini de corineforme cu această plasmidă "shuttle", s-a constatat că ea prezintă fenomene de instabilitate genetică: de structură şi/sau de segregare. Este posibil ca aceste fenomene de instabilitate plasmidială să fie determinate de procese de recombinare inter- şi/sau intramoleculară, care să implice două molecule plasmidiale şi/sau o moleculă plasmidială şi un cromozom.

Au fost construite *plasmide capabile să inducă mutaţii* la bacteriile corineforme. Aceste plasmide conţineau un element transportabil, izolat de la o bacterie corineformă şi un marker genetic (rezistenţa la un antibiotic).

De altfel, au fost realizate o serie de experimente de mutageneză situs specifică la tulpini de *Arthrobacter, Brevibacterium, Corynebacterium* şi *Rhodococcus* utilizând gena *sac B* izolată de la *Bacillus subtilis* ca marker pozitiv de selecţie, pentru *izolarea elementelor de inserţie*.

Ma Xuemei şi colaboratorii au utilizat *transpozonul conjugativ* T_n 916 pentru a induce mutaţii la *C.beikin* GM 93, în timpul conjugării între *E.coli* tulpina GC 120 şi *C.beikin* GM 93.

Frecvenţa de mutante auxotrofe în populaţie a fost de 88%.

Alte experienţe au urmărit *clonarea şi exprimarea diferitelor gene din calea de biosinteză a L-lizinei* de la *C.glutamicum*.

S-a demonstrat că o creştere a fluxului L-aspartat semialdehidei spre L-lizină poate fi obţinută la tulpini cu o activitate crescută a dihidrodipicolinat sintazei. Prin combinarea superexpresiei dihidrodipicolinat sintazei şi aspartokinazei poate creşte secreţia L-lizinei (10–20%). În plus, faţă de factorii consideraţi până în prezent a fi importanţi pentru superproducţia aminoacidului, trebuie să fie luată în considerare şi excreţia acestuia în mediul de cultură.

Recent, s-a demonstrat că L-glutamatul, L-lizina şi L-izoleucina nu sunt secretate prin difuzie pasivă, ci prin sisteme de transport active.

Studiul tulpinii *C.glutamicum* superproducătoare de lizină a indicat că acest transport are o puternică influenţă asupra superproducţiei acestui aminoacid. Pentru construirea unor tulpini puternic producătoare de lizină, utilizând tehnicile de clonare genică, este necesară şi *superexpresia genelor implicate în sistemele de transport.*

Deşi tehnologia ADN recombinant este utilă pentru ameliorarea genetică a bacteriilor, numeroase probleme împiedică progresul rapid în acest domeniu. Acestea includ informaţiile limitate despre genetica moleculară a bacteriilor, diversitatea tulpinilor producătoare utilizate şi complexitatea căilor de biosinteză ale aminoacizilor.

9.2.1.3. Obţinerea L-lizinei prin biosinteză

Metode de obţinere. L-lizina poate fi obţinută prin trei metode: extracţie din produse naturale, sinteză chimică, biosinteză.

Extracţia din produse naturale (caseina, gelatina, glutenul de grâu sau soia). Pe această cale se obţin produse optic-active (L). Însă, cantitatea mare de materii prime necesare, producţia redusă şi preţul de cost ridicat au impus elaborarea altor metode mai economice.

Sinteza chimică. Cea mai rentabilă este metoda care pleacă de la caprolactamă. Metoda are dezavantajul, pe lângă faptul că este grea şi costisitoare, că se obţin preparate racemice, care trebuie separate apoi în cei doi antipozi optici.

Biosinteza. Metoda microbiologică are avantajul folosirii unor materii prime ieftine, dar producţia respectivă necesită timp şi aminoacizii formaţi trebuie separaţi de alţi aminoacizi din mediu şi de diferite impurităţi, inclusiv celulele microbiene.

Primul procedeu de obţinere a L-lizinei, *sinteza în două etape*, a fost elaborat de firma Pleizer în 1956.

Conform acestuia, L-lizina se obţine în două etape: biosinteza acidului diaminopimelic (DAP) şi decarboxilarea enzimatică a acidului diaminopimelic cu formarea L-lizinei.

După acest procedeu, se cultivă în prima fază, pe un mediu cu extract de porumb şi adaos de săruri minerale, o mutantă lizinodependentă de *E.coli* capabilă

să producă acumularea de acid diaminopimelic. Simultan se cultivă o tulpină de *E.coli* sau *Aerobacter aerogenes* care posedă DAP-decarboxilază, enzimă ce produce decarboxilarea DAP la lizină. Suspensia celulară de *A.aerogenes* este supusă acțiunii agenților chimici (butanol, toluen) sau fizici (ultrasunete) pentru eliberarea enzimei.

În faza a doua se amestecă cele două soluții nutritive și se continuă fermentația, timp în care are loc decarboxilarea acidului diaminopimelic cu formarea L-lizinei.

Sinteza în două etape a fost abandonată; în prezent, metoda cea mai folosită este *sinteza directă.* Aceasta a fost realizată de Kinoshita și colaboratorii săi în 1958. Folosind ca agenți mutageni radiații UV sau radiații Γ, Kinoshita a obținut o serie de mutante biochimice de la *C.glutamicum,* toate fiind mutante auxotrofe de diferiți aminoacizi. Printre aceste mutante, 4 prezentau interes mai mare:

- mutantă auxotrofă de homoserină și biotină ($Homoser^-$, Bio^-);
- mutantă auxotrofă de metionină (Met^-);
- mutantă auxotrofă de metionină și leucină (Met^-, Leu);
- mutantă auxotrofă de izoleucină (Ile^-).

Dintre acestea, cea care dă rezultatele cele mai bune, sub raportul acumulării de lizină în cantitate mare, este mutanta auxotrofă de homoserină și biotină, care a fost introdusă în practica industrială.

Procedeul de biosinteză a lizinei într-o singură etapă a fost transpus la scară industrială în 1960. Conform procedeului elaborat de firma Kyowa Hakko Kogyo, se cultivă o mutantă de *C.glutamicum* pe un mediu ce conține o sursă de carbon, surse de azot, săruri minerale și aminoacizi (homoserină, metionină, treonină), obținând direct L-lizină.

Fermentația se efectuează în condiții aerobe, între 24 și 37°C, la un *p*H cuprins între 5 și 8,5.

Durata fermentației este de 4–5 zile și asigură acumularea în mediu a unei cantități de L-lizină de 20–25 g/l. Din mediul fermentat rezultat de la biosinteză se poate separa L-lizină în stare pură prin adsorbție pe cationiți puternici, eluție cu baza slabă, concentrarea eluatului și cristalizarea produsului pur.

Pentru produsul destinat uzului veterinar, biomasa rezultată de la fermentație se prelucrează prin atomizare, obținându-se în final un amestec de L-lizină și masă bacteriană, amestec ce conține 10% L-lizină și constituie un valoros biostimulator.

Mecanismul de biosinteză a L-lizinei. Substanța cheie de la care se pornește biosinteza L-lizinei este *acidul aspartic.* Acidul aspartic poate fi sintetizat prin două reacții diferite, folosind un substrat care este un produs al ciclului acizilor tricarboxilici (ciclul TCA).

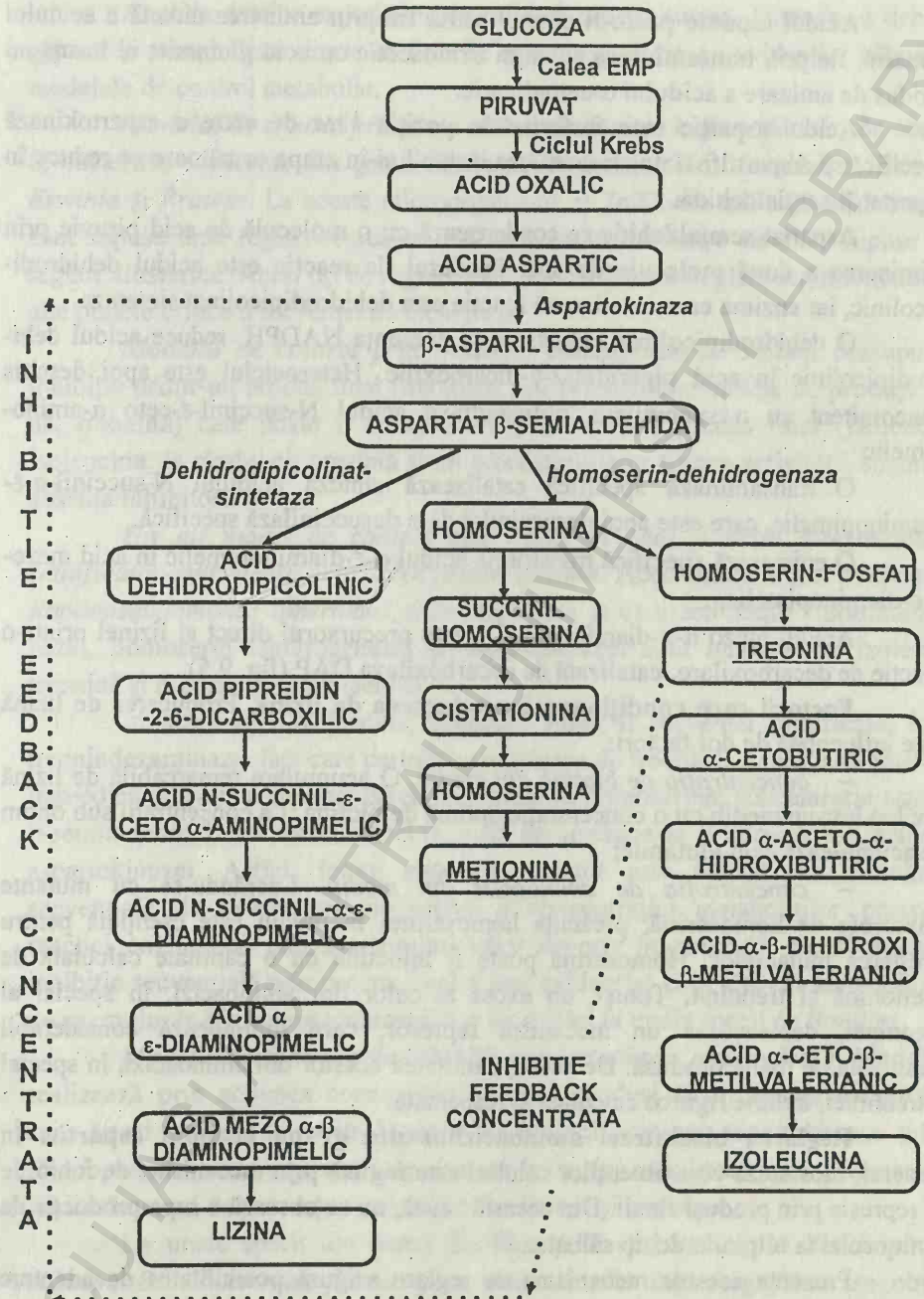


Fig.9.5. Reglarea biosintezei lizinei la *Corynebacterium glutamicum* şi *Brevibacterium sp.*

Acidul aspartic poate fi obţinut astfel fie prin aminarea directă a acidului fumaric, fie prin transaminarea acidului oxaloacetic cu acid glutamic, el însuşi un produs de aminare a acidului α-cetoglutaric.

Acidul aspartic este fosforilat în poziţia *beta* de către o aspartokinază specifică. β-Aspartilfosfatul format este instabil şi în etapa următoare se reduce în aspartat-β-semialdehidă.

Aspartat-semialdehida se condensează cu o moleculă de acid piruvic prin eliminarea a două molecule de apă. Produsul de reacţie este acidul dehidrodipicolinic, iar enzima care catalizează reacţia este dehidrodipicolinat sintetaza.

O dehidrodipicolinat reductază, în prezenţa NADPH, reduce acidul dehidrodipicolinic în acid piperidin-2-6-dicarboxilic. Heterociclul este apoi deschis concomitent cu o succinilare, obţinându-se acidul N-succinil-ε-ceto α-aminopimelic.

O transaminază specifică catalizează sinteza acidului N-succinil-α-ε-diaminopimelic, care este apoi desuccinilat de o desuccinilază specifică.

O epimerază specifică transformă acidul α-ε-diaminopimelic în acid mezo-α-ε-diaminopimelic.

Acidul mezo α-ε-diaminopimelic este precursorul direct al lizinei printr-o reacţie de decarboxilare, catalizată de decarboxilaza DAP (fig. 9.5).

Factorii care condiţionează producerea de lizină. Producerea de lizină este influenţată de doi factori:

– *concentraţia de biotină din mediu.* O acumulare remarcabilă de lizină are loc într-un mediu cu o concentraţie optimă de biotină. La concentraţii sub optim se acumulează acid glutamic;

– *concentraţia de aminoacizi din mediu.* Lucrându-se cu mutante auxotrofe de homoserină, prezenţa homoserinei în mediu este esenţială pentru creşterea mutantelor. Homoserina poate fi înlocuită cu o cantitate calculată de metionină şi treonină. Totuşi, un exces al celor doi aminoacizi, în special al treoninei, declanşează un mecanism represor, care diminuează considerabil cantitatea de lizină produsă. De aceea, cantitatea acestor doi aminoacizi, în special a treoninei, trebuie riguros calculată şi respectată.

Reglarea biosintezei aminoacizilor din grupa acidului aspartic. În general, biosinteza constituenţilor celulari este reglată prin mecanisme de inhibiţie şi represie prin produşi finali. Din această cauză, nu se observă o supraproducţie de aminoacizi la tulpinile de tip sălbatic.

Prezenţa acestor mecanisme de reglare asigură posibilitatea de adaptare rapidă şi eficace a microorganismelor la schimbările mediului înconjurător.

Lizina aparţine familiei acidului aspartic, fiind produsă din acid aspartic, pe o cale ramificată, împreună cu treonina, metionina şi izoleucină. Calea de biosinteză este aceeaşi la toate bacteriile testate până în prezent, dar mecanismele de control metabolic diferă.

Analiza datelor experimentale privind aspartokinaza, homoserin dehidrogenaza şi treonindezaminaza în diferite microorganisme au evidenţiat câteva din modelele de control metabolic.

Modelul de control printr-un sistem de enzime izofuncţionale. Se observă la bacteriile coliforme din genul *Escherichia, Salmonella, Aerobacter, Serratia, Erwinia* şi *Proteus*. La aceste microorganisme se întâlnesc trei aspartokinaze care sunt supuse unei reglări represive distincte, iar două dintre ele sunt supuse unei reglări alosterice. Acest tip de reglare este intensificat de reglări suplimentare şi în alte puncte critice a secvenţei de biosinteză.

Modelul de control prin inhibiţie compensatorie. Acesta presupune o inhibiţie printr-un produs final (treonină) sau printr-o combinaţie de produşi (lizină, treonină) care poate fi compensată printr-un alt produs final (izoleucină). Isoleucina, la rândul ei, prezintă şi un efect stimulator asupra activităţii enzimei în absenţa inhibitorilor.

Un alt model de control este acela în care punctul intermediar de ramificaţie controlează activitatea primei enzime. Acest model a fost evidenţiat la *Rhodopseudomonas spheroides*, microorganism la care activităţile treonindezaminazei, homoserin-dehidrogenazei şi aspartokinazei sunt inhibate de izoleucină, treonină şi aspartat β-semialdehidă.

În acest caz, izoleucina, produsul final al secvenţei ramificate, inhibă treonindezaminaza, fapt care permite acumularea de treonină. Aceasta, la rândul ei, împiedică conversia aspartat-β-semialdehidei în homoserină; concentraţia aspartat-β-semialdehidei este astfel crescută, ceea ce conduce la o micşorare a activităţii aspartokinazei. Astfel, întreg sistemul reglator este format din evenimente secvenţiale de descreşteri progresive a concentraţiei metaboliţilor precedenţi reacţiei enzimatice prin aşa-numitul *efect negativ în cascadă*. Acest model de inhibiţie secvenţială prin produs final a fost evidenţiat şi în alte căi metabolice ca, de exemplu, în biosinteza aminoacizilor aromatici la unele specii de *Bacillus*.

Modelul de control prin inhibiţie concertată sau multivalentă. Modelul se realizează prin acţiunea concomitentă a doi produşi finali asupra aspartokinazei. Acest model de control poate fi exemplificat pe aspartokinaza tulpinii *Rhodopseudomonas capsulata*. În această bacterie, activitatea aspartokinazei este inhibată numai de prezenţa concomitentă a lizinei şi treoninei.

La unele specii din genul *Bacillus* şi *Pseudomonas*, la *Rhodospirillum rubrum, Brevibacterium flavum* şi o serie de alte microorganisme se observă variaţii de la modelul amintit anterior.

Se produce inhibiţia concertată prin lizină plus treonină asupra activităţii aspartokinazei concomitent cu inhibiţia manifestată de fiecare din aceşti aminoacizi în parte. Acest model de inhibiţie se observă la majoritatea microorganismelor.

La *Rhodospirillum rubrum* şi *Brevibacterium flavum* acţiunea concertată a lizinei plus treonina poate fi reversată fie prin adaos de izoleucină, fie prin metionină sau valină.

Se cunoaşte că *L-izoleucina* şi *L-metionina* represează expresia operonului *hom thr B* (gena *hom* codificatoare de homoserin dehidrogenază formează o unitate transcripţională împreună cu gena *thr B* codificatoare de homoserinkinază) de la *C.glutamicum* printr-un mecanism încă necunoscut. În consecinţă, izoleucina determină o creştere considerabilă a acumulării L-lizinei.

Adăugarea exogenă a L-metioninei are drept rezultat expresia homoserin dehidrogenazei, cu o scădere concomitentă a concentraţiei de L-treonină.

Scăderea concentraţiei de treonină are drept consecinţă scăderea inhibiţiei alosterice a aspartokinazei, care în final determină o creştere a fluxului de L-lizină.

Represia homoserin dehidrogenazei dependentă de L-metionină a fost evidenţiată la *C.glutamicum* şi *C.glutamicum* sub *sp. flavum*, având drept consecinţă reducerea nivelului enzimei până la cel mult 20% în mediul sintetic.

La *Pseudomonas putida* şi *Pseudomonas fluorescens* se observă, în afară de inhibiţia aspartokinazei prin lizină plus treonină, şi inhibiţia prin metionină plus treonină.

Indiferent de micile modificări observate în cazul inhibiţiei concertate prin produs final, *acest model de control reprezintă un mod important de reglare a primei enzime din metabolismul ramificat al acidului aspartic.*

Concomitent cu controlul inhibitoriu al activităţii enzimei prin mai mulţi produşi finali şi sinteza unor enzime poate fi represată de prezenţa simultană a câtorva produşi finali.

La *C.glutamicum* şi la *Brevibacterium sp.* există numai *două puncte critice* în care biosinteza lizinei poate fi limitată:

– aspartokinaza, a cărei activitate poate fi inhibată printr-o inhibiţie feed-back, concertată de prezenţa simultană a unui exces de lizină şi treonină în mediu. Nici unul dintre aceşti doi aminoacizi nu poate exercita această inhibiţie separat, ci numai împreună;

– devierea la homoserină, prin homoserin-dehidrogenază.

S-au găsit trei modalităţi prin care aceste două blocări pot fi eliminate printr-o singură mutaţie.

Folosirea mutantelor auxotrofe de homoserină sau homoserin-dependente (*Hom⁻*). Aceste mutante au activitatea homoserin-dehidrogenazică anulată, astfel încât aspartat-β-semialdehida nu va mai fi deviată la homoserină şi, deci, va fi utilizată complet pentru producerea de lizină.

Folosirea mutantelor sensibile la treonină sau metionină. Aceste mutante au fost izolate ca revertanţi prototrofi de la o tulpină *Hom⁻*.

Ele posedă o activitate homoserin-dehidrogenazică scăzută, astfel încât aspartat-β-semialdehida va fi deviată la homoserină cu o rată redusă, fiind folosită în special pentru biosinteza lizinei.

În al doilea rând, aceste mutante sunt capabile să sintetizeze numai cantităţi minime de treonină internă, ele fiind sensibile la concentraţii mari de treonină. Ca urmare, datorită concentraţiei scăzute de treonină, aspartokinaza nu poate fi inhibată în activitatea ei, chiar la concentraţii mari de lizină.

Folosirea mutantelor rezistente la un analog al lizinei: S-2-(aminoetil)-L-cisteină (AEC^r). În mod normal, creşterea bacteriei *Brevibacterium flavum* este inhibată de S-(2-aminoetil)-L-cisteină. Inhibiţia este intensificată în mod marcat de L-treonină şi reversată de L-lizină. Aceasta înseamnă că S-(2-aminoetil)-L-cisteină funcţionează ca fals inhibitor feedback al aspartokinazei, enzimă reglatoare cheie din calea comună de biosinteză a lizinei. De aceea, unele mutante rezistente la S-(2-aminoetil)-L-cisteină este de aşteptat să fie mutante reglatoare, adică să aibă aspartokinaza insensibilă la inhibiţia feedback concertată, exercitată de treonină şi lizină. Într-adevăr, printre mutantele rezistente la S-(2-aminoetil)-L-cisteină, s-au găsit buni producători de lizină (31-33 g/l) care pot creşte atât în prezenţa S-(2-aminoetil)-L-cisteină, cât şi a treoninei.

Aspartokinaza, la aceste mutante, este de aproximativ 150 de ori mai puţin sensibilă la inhibiţia feedback exercitată de lizină şi treonină, comparativ cu enzima din tulpina parentală.

În ceea ce priveşte homoserin-dehidrogenaza, la aceste mutante, activitatea acestei enzime este inhibată uşor printr-o inhibiţie feedback de prezenţa în mediu a unui mic exces de treonină, sau izoleucină.

De regulă, la *C.glutamicum* şi *Brevibacterium sp.* se întâlneşte o singură aspartokinază multivalent reglată.

Totuşi, se pare că la *B.lactofermentum* 2256 există cel puţin două izoenzime ale aspartokinazei, una fiind sensibilă numai la lizină, iar alta la lizină şi treonină.

Spre deosebire de *C.glutamicum* şi *Brevibacterium sp.*, la *E.coli* lizina inhibă nu numai aspartokinaza (prima enzimă a căii comune), ci şi dehidrodipicolinat-sintetaza (prima enzimă a ramurii specifice). Aceasta deosebeşte net pe *E.coli* de producătorii de lizină folosiţi în industrie, tip *C.glutamicum*, la care dehidrodipicolinat-sintetaza este insensibilă la inhibiţia feedback exercitată de lizină. Pentru producerea de lizină cu *E.coli*, ar trebui eliminate un număr mai mare de situsuri reglatoare, ceea ce este destul de dificil.

De aceea, se preferă *C.glutamicum* sau *Brevibacterium* specific, la care printr-o singură mutaţie se elimină cele două puncte critice, asigurându-se acumularea în mediu a unei mai cantităţi de lizină.

9.2.1.4. Biosinteza lizinei în bioreactoare de laborator

Studii efectuate în bioreactoare de laborator cu o tulpină de *C.glutamicum* ATCC 2153 au evidenţiat patru faze ale procesului.

Faza I este marcată de creştere echilibrată şi de acumulare scăzută sau absentă a produşilor intermediari (excepţie CO_2).

Durata fazei 1, ca şi concentraţia biomasei la sfârşitul acestei faze, este guvernată de stocul iniţial de treonină, care împreună cu lizina inhibă aspartokinaza, prevenind superproducţia de lizină

Faza a II-a a fermentaţiei începe cu epuizarea stocului de treonină, în mod clar printr-o pauză în respiraţie şi este marcată de rate înalte de producere a lizinei şi biomasei, respiraţie constantă şi un *RQ* (coeficient de respiraţie) ridicat de aproximativ 1,17 care este un indicator al superproducţiei lizinei. Faza a II-a durează aproximativ 4–5 ore, dar poate fi prelungită cu ajutorul *RQ*, ce controlează adiţia treoninei, ori prin cultivarea unei tulpini AEC^r.

Creşterea biomasei în timpul acestei faze este probabil datorată ori rezervelor de treonină, ori creşterii constituenţilor celulari (incluzând totalul proteinelor).

Modificările morfologiei celulelor care acompaniază depleţia treoninei extracelulare sunt destul de complexe şi foarte importante în sinteza lizinei, dar nu au fost investigate .

Faza a III-a începe cu un platou al creşterii şi este marcată de rate înalte ale producerii lizinei şi de descreşterea respiraţiei şi a *RQ* .

Faza a IV-a reprezintă în esenţă faza letală, evidenţiată prin reducerea gradată a producerii lizinei, descreşterea concentraţiei biomasei şi redirecţionarea glucozei spre formarea produşilor intermediari, cum ar fi: piruvat, acetat, alanină, valină, ca şi mici cantităţi de metaboliţi neidentificaţi, redirecţionare care poate fi asociată cu pierderea activităţii complexului piruvat dehidrogenază ori a enzimelor implicate în ciclul TCA, cum ar fi α-cetoglutarat dehidrogenază.

Se pare că descreşterea sintezei lizinei în această fază este datorată reducerii activităţii enzimelor primare, cum ar fi: complexul fosfoenolpiruvat carboxilază, care nu poate fi reactivată prea mult timp datorită absenţei treoninei şi pierderii turnoverului proteinei.

Probele de biomasă ale fazei I, a III-a şi a IV-a nu erau semnificativ diferite în ceea ce priveşte compoziţia elementară.

Peste tot, randamentul molar al lizinei în cazul fermentaţiei controlate a fost de numai 15%, randamentul molar instantaneu al lizinei în fiecare fază a fost: faza I – 0%; faza a II-a – 30%; faza a III-a – 20%; faza a IV-a – 10%.

Deşi faza I poate fi eliminată prin folosirea unei tulpini AEC^r de *C.glutamicum*, utilizarea altor tulpini a înlăturat necesitatea studiului distribuţiei fluxului metabolic, asociat cu superproducţia lizinei.

Similar, tehnicile "fed-batch" (alimentare discontinuă) pot fi folosite pentru a înlătura faza a IV-a.

În consecință, numai fazele a II-a și a III-a prezintă interes pentru perspectivele bioingineriei în fermentația L-lizinei.

Cea mai dramatică transformare metabolică este observată la nivelul distribuției fluxului, între faza I și a II-a a fermentației. Această "perturbare" metabolică este indusă de o dereglare bruscă a sintezei lizinei care cauzează o redistribuție temporară a fluxului din metabolismul primar, de la biomasă spre sinteza lizinei.

În timpul etapelor timpurii din faza a II-a, este observată cea mai înaltă încărcătură metabolică, deoarece ratele producerii lizinei și biomasei sunt apropiate de maximele lor.

În faza a III-a, glucoza este dirijată spre trehaloză și produși intermediari ai piruvatului, iar fluxurile susținute de glicoliză și ciclul TCA sunt diminuate.

Tendințele generale ale reacțiilor individuale, care pot fi deosebite în cele patru "tablouri" ale activității metabolice, sunt rezumate în fig. 9.6.

Deși fluxul suportat de calea pentozo-fosfat este semnificativ pe tot cuprinsul celor trei faze ale fermentației, tranziția de la faza I la faza a II-a este însoțită de o creștere a fluxului pentru a satisface necesitățile ridicate în NADPH, dar mai târziu scade datorită descreșterii ratei de creștere a biomasei.

Fracțiunea glucozei catalizată de fosfoenolpiruvat carboxilază este destul de semnificativă în cele patru fluxuri analizate; în timpul tranziției de la faza I la faza a II-a, fluxul este crescut.

Fluxul fosfoenolpiruvat carboxilazei revine la condițiile fazei I în faza a II-a, probabil datorită reducerii activității fosfoenolpiruvat carboxilazei (PPC).

Reacția PPC (*reacția 9*) este extrem de importantă, deoarece este singura reacție anaplerotică activă din metabolismul primar, când *C.glutamicum* este cultivat pe mediu minimal cu glucoză.

Distribuțiile fluxului demonstrează, de asemenea, că PPC fixează mari cantități de CO_2, care complică analizele cantitative ale metabolismului.

Fracția glucozei catabolizată prin ciclul TCA fluctuează în jurul mediei. De exemplu, în timpul fazei I, fluxul ciclului TCA este crescut, dar se reduce când începe superproducerea lizinei datorită devierii metaboliților spre sinteza lizinei în ramura fosfoenolpiruvatului și piruvatului. În etapele târzii ale fazei a II-a, fluxul ciclului TCA revine la nivelul ei inițial, dar apoi scade din nou în faza a III-a, datorită devierii glucozei spre produși intemediari.

Excesul de ATP generează reacția ATP = ADP; au loc fluctuații în trepte corelate cu fluxul ciclului TCA.

Sistemul fosfotransferazic PEP: glucoză

(1) GLC+PER=GLC6P+PYR

(2) GLC6P+0,5ATP=0,5TREHAL+0,5ADP

Calea Embden-Meyerhof-Parnas (ciclul glicolizei)

(3) GLP6P=FRU6P

(4) FRU6P+ATP=2GAP+ADP

(5) GAP+ADP+NAD=NADH+G3P+ATP

(6) G3P=PEP+H_2O

(7) PEP+ADP=ATP+PYR

(8) PYR+NADH=LAC+NADH

Reacţia anaplerotică; PEP carboxilaza

(9) PEP+CO_2=OOA

Ciclul acizilor tricarboxilici

(10) PYR+COA+NAD=ACCOA+CO_2+ +NADH

(11) ACCOA+OAA+H_2O=ISOCIT+COA

(12) ISOCIT+NADP=AKG+NADPH+CO_2

(13) AKG+COA+NDA=SUCCOA+CO_2+ +NADH

(14) SUCCOA+ADP+SUC+COA+ATP

(15) SUC+H_2O+FAD=MAL+FADH

(16) MAL+NAD=OAA+NADH

Producerea ori consumul acetatului

(17) ACCOA+ADP+AC+COA+ATP

Producerea glutamatului, glutaminelor, alaninei şi valinei

(18) NH3+AKG+NADPH=GLUT+H_2O+ +NADP

(19) GLUT+NH_3+ATP=GLUM+ADP

(20) PYR+GLUT=ALA+AKG

(21) 2PYR+NADPH+GLUT=VAL+CO_2+ +H_2O+NADP+AKG

Calea pentozo monofosfaţilor

(22) GLC6P+H_2O+2NADP=RIBU5P+CO_2+ +2NADPH

(23) RIBU5P=RIB5P

(24) RIBU5P=XYL5P

(25) XYL5P+RIB5P=SED7P+GAP

(26) SED7P+GAP=FRU6P+GAP

(27) XYL5P+E4P=FRU6P+E4P

Fosforilarea oxidativă P/O=2

(28) 2NADH+O_2+4ADP=2H_2O+4ATP+ +2NAD

(29) 2FADH+O_2+2ADP=2H_2O+2ATP +2FAD

Grupa acidului aspartic

(30) OAA+GLUT=ASP+AKG

(31) ASP+PYR+2NADPH+SUCCOA+ +GLU+ATP=SUC+AKG+CO_2+LYSI+ +2NADP

(32) LYSI=LYSE

Sinteza bimasei

(33) 0,021GLC6P+0,007FRU6P+0,09RIB5P+ +0,036E4P+0,013GAP+0,15G3P+ +0,052PEP+0,03PYR+0,332ACCOA+ +0,08ASP+0,033LYSI+0,446GLUT+ +0,025GLUM+0,054ALA+0,04VAL+ +0,052THR+0,015MET+0,43LEU+ +3,82ATP+0,476NADPH+0,312NAD= =BIOMAS+3,82ADP+0,364AKG+ +0,476NADP++0,312NADH+0,143CO_2

AC=acetat
ACCOA=acetil-coenzima A
AKG=α-cetoglutarat
ALA=alanină
ATP=adenozin 5'-trifosfat
BIOMAS=biomasă
CO_2=dioxid de carbon
E4P=eritrozo-4-fosfat
FADH=flavin adenin dinucleotid redus
FRU6P=fructozo-6-fosfat
G3P=3-fosfoglicerat
GAP=gliceraldehid-3-fosfat
GLC=glucoză
GLC6P=glucozo-6-fosfat
GLUM=glutamină
GLUT=acid glutamic
ISOCIT=izocitrat
LAC=lactat
LYSE=lizină, extracelular
LYSI=lizină, intracelular
MAL=malat
NADH=nicotinamid adenin dinucleotidă redusă
NADPH= nicotinamid adenin dinucleotidă fosfat redus
NH_3=amoniac
O_2=oxigen
OAA=oxaloacetat
PEP=fenol piruvat
PYR=piruvat
RIB5P=ribozo-5-fosfat
RIBU5P=ribulozo-5-fosfat
SED7P= sedoheptulozo-7-fosfat
SUC=succinat
SUCCOA=succinat coenzima A
TREHAL=trehaloză
VAL=valină
XYL5P=xilulozo-5-fosfat

Fig. 9.6. Reacţiile implicate in biosinteza L-lizinei.

Alte reacţii de interes includ piruvatkinaza, *reacţia 7*, care întotdeauna expune un flux mic, datorită dominaţiei fosfoenolpiruvatului; glucozofosfotransferaza, *reacţia 18*, care susţine întotdeauna un flux crescut, deoarece este prima reacţie ce permite încorporarea amoniacului liber în aminoacizi.

Analiza reţelei metabolice la *C.glutamicum*, realizată cu ajutorul datelor din literatură, a permis identificarea câtorva reacţii dependente, asociate cu reacţii anaplerotice, considerate a se exprima la bacteriile producătoare de acid glutamic. Cu ajutorul acestora, analizele intracelulare au încercat să identifice căile dominante.

Contrar publicaţiilor despre *B.flavum*, ocolirea glioxilatului pare a fi represată de prezenţa glucozei, ce părăseşte complexul fosfoenolpiruvat carboxilaza ca unică cale anaplerotică exprimată la *C.glutamicum* ATCC 21253.

Pentru a obţine un randament în lizină, din glucoză, cât mai apropiat de cel teoretic (75% molar), fluxul separat în punctele principale de ramificaţie (glucoză-6-fosfat, fosfoenolpiruvat şi piruvat) ale reacţiei metabolice primare de la *C.glutamicum* trebuie alterat semnificativ faţă de cel observat în timpul creşterii echilibrate, încât precursorii lizinei să fie sintetizaţi în raporturi stoechiometrice optime.

Distribuţiile fluxului la *C.glutamicum* din reţeaua metabolică, construite cu ajutorul datelor despre fermentaţie, au arătat că atât calea pentozofosfatului cât şi fosfoenolpiruvat carboxilazei susţin substanţial fluxul în timpul creşterii şi superproducţiei lizinei.

Analiza fluxului teoretic este utilă pentru consolidarea şi validarea reţelelor metabolice, identificarea punctelor de ramificaţii principale şi determinarea randamentelor teoretice maxime.

Cu toate acestea, există limitări în ceea ce priveşte extinderea rezultatelor care pot fi obţinute din distribuţiile fluxului experimental realizat pe sisteme neperturbate.

Analiza fluxului în timpul perturbărilor metabolice locale induse experimental poate fi folosită pentru elucidarea şi clarificarea posibilelor surse ale rigidităţii metabolice. În cazul superproducţiei lizinei la *C.glutamicum*, studiul perturbărilor a indicat faptul că punctele de ramificaţie glucoză-6-fosfat şi piruvat sunt flexibile şi randamentul lizinei pare a fi constrâns de flexibilitatea nodului fosfoenolpiruvat.

Recent, s-a descoperit o nouă metodă pentru determinarea fluxurilor din metabolismul central de la *C.glutamicum*. Metoda combină puterea spectroscopiei de rezonanţă magnetică nucleară ^{1}H-detectoare de C^{13} de a urmări carbonii individuali, cu simplitatea stabilirii bilanţului carbonilor din culturile bacteriene. Astfel, la *C.glutamicum* s-a stabilit că fluxul ce urmează calea pentozo-fosfat este de 66,4% (relativ faţă de fluxul input al glucozei de 1,49 m mol/g greutate uscată şi h), intrarea în ciclul TCA 62,2%, iar contribuţia succinilazei la sinteza lizinei – 13,7%.

Influenţa factorilor de mediu asupra biosintezei L-lizinei. L-Lizina, ca şi ceilalţi acizi organici, se obţine prin fermentaţie.

Randamentul de obţinere a L-lizinei şi viteza procesului de fermentaţie sunt influenţate de compoziţia mediului de cultură, aportul de oxigen, *p*H, agitare, temperatură şi durata fermentaţiei.

Compoziţia mediului de cultură are un rol hotărâtor în procesul de biosinteză al lizinei, deoarece microorganismul producător are nevoie de surse de carbon, azot, substanţe minerale, aminoacizi, iar toate acestea dozate în limite foarte strânse.

Sursa de carbon. Lizina se obţine industrial, pe un mediu de cultură glucozo-mineral, în condiţii de aerare şi la *p*H neutru. Cercetările efectuate au arătat că înlocuirea glucozei cu zaharoza măreşte producţia de lizină. Din acest punct de vedere, *melasa* este o foarte bună sursă de carbon pentru producţia de lizină.

Melasa este un subprodus rezultat din fabricarea zahărului din sfeclă de zahăr. Are o compoziţie complexă şi poate servi, în acelaşi timp, ca sursă de săruri minerale, aminoacizi şi vitamine.

Cercetările efectuate au demonstrat marea variabilitate chimică a melaselor. Variabilitatea este determinată atât de compoziţia diferită în aminoacizi, biotină, zaharoză invertită, *p*H, cât şi de substanţele dăunătoare, cum sunt: caramelul, substanţele melanoide, substanţele humice etc.

Melasele cu *p*H scăzut, cu un procent crescut de zaharoză invertită, la care lipsesc aminoacizi necesari biosintezei (metionină şi treonină), şi cu conţinut crescut în substanţe colorate (caramel, substanţe melanoide) conduc la rezultate scăzute în fermentaţie.

Melasele au fost delimitate în categorii de calitate: melase de calitatea I, care dau niveluri de biosinteză ridicată (40–45 g/l L-lizină x HCl), melase de calitatea a II-a, care dau niveluri medii de biosinteză (30–40 g/l L-lizină x HCl) şi melasă necorespunzătoare pentru biosinteza L-lizinei.

Activităţile medii în L-lizină obţinută pe materii prime de calitatea I au fost de 45 g/l în 66 ore de fermentaţie. În aceste condiţii, randamentul de transformare a atins valori maxime de 40%, randament care conform literaturii de specialitate este un randament optim.

În afara melasei, s-au folosit şi alţi compuşi ca sursă de carbon. Astfel, în 1978, Bacina şi colaboratorii citaţi de Săsărman E. au pus la punct un procedeu de biosinteză pe medii cu *acetat.*

Autorii cehi au folosit pentru biosinteza L-lizinei o mutantă de *Micrococcus glutamicus* şi un mediu conţinând *suc de sfeclă de zahăr, zahăr şi săruri minerale,* obţinând în 48 h de fermentaţie 22,2 g/l L-lizină. Pentru protejarea fermentaţiei de contaminări secundare care descompun lizina în cadaverină, au folosit o serie de inhibitori ca nitrofurazonă, furazolidonă şi acizi *p*-aminosalicilici.

Un grup de cercetători japonezi de la firma Ajinomoto au izolat o mutantă, denumită *B.lactofermentum* ATCC 21086, cu o productivitate de 40–52 g/l L-lizină. Biosinteza lizinei cu această mutantă se realizează pe un mediu conținând ca sursă de carbon: *glucoză, fructoză, maltoză, zaharoză, xiloză, hidrolizate de amidon, melase și acizi organici* în concentrație de 10–15%.

Firma japoneză Tokkoshia Co, Ltd, a elaborat un procedeu nou de obținere a L-lizinei, folosind ca sursă de carbon *acidul aspartic*. Acest procedeu a fost aplicat mutantei auxotrofe *C.acetophilum* NRLL B-3421.

În general, procedeele de biosinteză a L-lizinei în care sursa de carbon folosită este acidul acetic, acetatul de amoniu, sunt mai greu de efectuat întrucât concentrația acestora în mediu nu trebuie să depășească valoarea de 1,5%.

Consumul de zahăr este lent în primele 24 de ore de fermentație, pentru ca în următoarele 25–26 de ore (etapa creșterii logaritmice a masei celulare) să crească foarte mult, după care scade în toată perioada biosintezei L-lizinei.

Pentru asigurarea surselor de carbon în timpul elaborării L-lizinei se urmărește ca după 40 de ore de fermentație cantitatea de zahăr să fie cuprinsă între 2,5–3%.

Sursa de azot. Necesarul de azot în procesul de biosinteză a L-lizinei este asigurat, pe de o parte de surse de azot organic, iar pe de altă parte de sursele de azot anorganic.

Ca *sursă de azot organic* se utilizează extractul de porumb și extractul de cartofi, preferabil fiind *extractul de porumb* care, fiind bogat în aminoacizi, oferă randamente superioare.

Extractul de porumb, subprodusul rezultat din fabricarea glucozei din porumb, folosit în principal ca sursă de azot, poate fi în același timp și sursă de săruri minerale, în special pentru ionii de fosfor, precum și de vitamine. Analizele chimice ale extractelor de porumb au demonstrat o variabilitate mai mică a componentelor chimice, comparativ cu variabilitatea melaselor, fapt care s-a reflectat și asupra procesului de biosinteză a producătorilor.

Recent, s-a elaborat un procedeu care constă în aceea că extractul de porumb se înlocuiește, în proporție de 80–84%, cu un *hidrolizat acid de șrot de soia, sau de drojdie, sau de gluten*. Prin aplicarea acestui procedeu, se lărgește gama de produse naturale utilizate ca sursă de azot și factori de creștere în biosinteza L-lizinei.

La o mutantă de *M.glutamicus* s-au folosit ca sursă de azot, de către autorii cehi, materii prime ieftine ca: *orz, paie și tărâțe*. În acest ultim caz, randamentele în L-lizină sunt mult mai scăzute. Când se folosesc ca sursă de azot *hidrolizate de miceliu* rezultate din producția industrială a penicilinei și tetraciclinei, activitățile în L-lizină ating valori de 40,5 g/l în 38 ore de fermentație.

Autorii japonezi citați de Săsărman E. au folosit, pentru sinteza L-lizinei cu mutante duble provenite din genul *Corynebacterium*, drept sursă de *azot făină de peşte, bulion, casaminoacid, extracte solubile de peşte, extracte din paie de orez*, adăugate separat sau în diferite combinații (în plus față de mediile clasice).

Ca *surse de azot anorganic* se folosesc *săruri de amoniu* în cantitate de 1,2–3,5%, iar corectarea *p*H-ului pe tot parcursul fermentației făcându-se cu ape amoniacale. Azotul total din lichidul de cultură ajunge la 6,5–8,5%.

O mutantă denumită *B.lactofermentum* ATCC 21086, izolată la firma Ajinomoto, prezintă o productivitate de 40–52 g/l L-lizină, folosindu-se ca sursă de azot săruri de amoniu ca: $ClNH_4$, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2CO_3$, amoniac gazos sau în soluție.

Dintre toate sursele de azot, *sulfatul de amoniu* dă cele mai bune rezultate; un adaos de "corn-steep liqueur" (extract de porumb) până la concentrația de 4% măreşte, de asemenea, producția de lizină.

Sărurile minerale. Prezența substanțelor minerale este vitală în procesul de creştere a masei celulare, deoarece ele reglează atât permeabilitatea țesutului celular, cât şi echilibrul ionic.

La mutanta denumită *B. lactofermentum* ATCC 21086 s-au folosit, pentru biosinteza L-lizinei cu o productivitate de 40–52 g/l L-lizină, drept săruri minerale: fosfat de K, sulfat de Mg, Mn, Zn şi Fe.

Aminoacizii. S-a dovedit că nivelul producției L-lizinei este controlat şi de aminoacizii din mediul nutritiv. Prezența *biotinei* şi a *homoserinei* în mediu este esențială.

S-a descoperit că adăugarea *L-metioninei* la tipul sălbatic *C.glutamicum* are drept consecință excreția L-lizinei până la 2,5 n mol/min/mg (greutate uscată).

La *Brevibacterium sp.* P_{1-13} s-a observat că atât creşterea masei celulare cât şi producția L-lizinei prezintă proporții crescute în urma adăugirii *DL-izoleucinei* şi *L-leucinei.*

9.2.1.5. Influența *p*H-ului şi a temperaturii asupra biosintezei L-lizinei

Studii efectuate au arătat că *p*H-ul, înainte de sterilizare, nu influențează semnificativ nivelul de biosinteză. Cunoscut fiind faptul că, la temperaturi ridicate şi la valori de *p*H acide, pot avea loc degradări ale mediului prin formarea de compuşi de tip melanoidic (aminoglucide), iar la valori alcaline are loc degradarea zaharozei în caramel, se recomandă ca valori optime de *p*H cele cuprinse între 6 şi 7.

În procesul de fermentație se remarcă, în primele 30–35 de ore, o puternică tendință de scădere a *p*H-ului, iar menținerea sa la valoarea optimă (7–7,2) se face cu hidroxid de amoniu.

După 45–50 de ore începe acumularea de L-lizină şi ca urmare *p*H-ul creşte spre sfârşitul biosintezei până la 8–8,2.

S-a observat că producerea lizinei decurge foarte lent la 28°C şi foarte prost la 37°C.

Influenţa aeraţiei asupra biosintezei L-lizinei. Aeraţia este un factor extrem de important, deoarece producerea aminoacizilor decurge cel mai bine când mediul este bine aerat. Agitarea este necesară pentru a mări gradul de aerare.

Zaiţeva, citată de Săsărman E., a stabilit că mutantele auxotrofe derivate din tulpini sălbatice de *Micrococcus*, în condiţiile la care se asigură o viteză de dezvoltare a oxigenului egală cu 48–50 mg/l/min, conduc la activităţi maxime în L-lizină (25 g/l). Când nivelul oxigenului dizolvat din mediu scade sub optim, biosinteza se deplasează înspre formarea alaninei, valinei sau acidului lactic. Legat de problemele de aeraţie intensă pe care le necesită tulpina şi ţinând cont de faptul că aerul steril necesar în fermentaţiile industriale are un preţ de cost limitat, Mindlin, citat de Săsărman E., a indus, cu radiaţii UV şi cu dietil sulfat, *mutante pitice*, care au păstrat caracteristica de a produce L-lizină a tulpinilor iniţiale, dar s-au deosebit de acestea prin faptul că au nevoie de un debit mai mic de aerare pe parcursul biosintezei. Mai mult, mutantele pitice au format cantităţi mici de aminoacizi secundari.

Influenţa calităţii materiilor prime asupra biosintezei L-lizinei. Randamentul de biosinteză al lizinei depinde foarte mult de calitatea materiilor prime folosite şi în primul rând al melasei şi al extractului de porumb.

Studiul asupra evoluţiei curbelor de creştere a producătorului *B.lactofermentum* ICCF-3 pe medii de fermentaţie cu materii prime de diferite provenienţe, a evidenţiat următoarele:

– pe *materii prime de calitate corespunzătoare*, curba de dezvoltare a fost tipică, evidenţiindu-se o fază *lag* slab exprimată, datorită raportului de însămânţare ridicat în fermentaţie (10%), o fază logaritmică, o fază staţionară şi o fază de declin. S-a observat, de asemenea, că este necesară acumularea unei anumite cantităţi de biomasă, ceea ce a permis tragerea concluziei că biosinteza L-lizinei este direct proporţională cu acumularea de biomasă în anumite limite;

– pe *materii prime necorespunzătoare*, curba de multiplicare este atipică: se observă o prelungire a fazei de lag, urmată de instalarea fazei exponenţiale pe tot parcursul fermentaţiei. Cantitativ, se formează mai puţină biomasă decât în primul caz. În general, nivelul de biosinteză realizat în fermentaţii cu acest tip de dezvoltare este sub nivelul atins de biomasa formată pe materii prime corespunzătoare.

Componentele optime ale unui mediu de fermentaţie. În urma cercetărilor efectuate, s-au stabilit componentele optime ale unui mediu de fermentaţie. Astfel, Kikova şi colaboratorii au obţinut 21,3 g valină/dm^3 şi

13,5 g lizină/dm^3 pe un mediu de fermentație ale cărui componente optime erau reprezentate de: 25% melasă, 3,5% $(NH_4)_2SO_4$ și 0,075% KH_2PO_4.

În țara noastră, în fermentațiile industriale, s-au folosit medii de cultură ce conțineau 3% extract de porumb, 10–12% melasă, 3% săruri de amoniu, 0,02% sulfat de zinc, magneziu, mangan, 1% carbonat de calciu și 0,2% ulei.

Recent, s-a stabilit un nou proces de fermentație *pentru superproducerea simultană a lizinei și acidului glutamic*. Acest proces constă în cultivarea unei tulpini producătoare de lizină folosind metode utilizate pentru producerea acidului glutamic, și anume cultivare cu agenți tensioactivi ori penicilină. Fără a se adăuga $(NH_4)_2SO_4$ în mediu, s-a obținut producerea simultană a lizinei și acidului glutamic, cu o productivitate de 1,3–1,4 ori mai mare.

În ceea ce privește producția mondială de lizină, Japonia se află pe primul loc, deoarece a reușit să obțină în cultură continuă 80–100% lizină.

În țara noastră s-a obținut între anii 1970–1972, prin lucrări de mutageneză cu radiații UV și cu nitrozoguanidină, o mutantă auxotrofă de biotină și homoserină, folosind ca tulpină parentală *B. lactofermentum* ATCC 13896, desemnată sub denumiea de *B. lactofermentum* ICCF-3 și care produce 35–40 g/l lizină.

Procedeul a fost industrializat în 1975 la Fabrica de Antibiotice din Iași, obținându-se 37,5–40 g/l L-lizină. Produsul de uz furajer s-a obținut printr-un procedeu de atomizare, pe suport de carbonat de calciu. Conținutul în L-lizină · HCl în produs a fost de minimum 10%.

Din mediul de fermentație, s-a pus la punct un procedeu de purificare a L-lizinei în cadrul secției Biosinteze a Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București, obținându-se un produs de uz farmaceutic, utilizat în producția de vaccinuri (în compoziția mediilor de cultură), la Institutul Cantacuzino (Jurcoane St. și colab., 1986).

9.2.1.6. Izolarea și purificarea L-lizinei din medii de biosinteză

L-lizina se obține printr-un proces de biosinteză pe medii care au în componență subproduse ale industriei alimentare (melasă și extract de porumb). În vederea recuperării L-lizinei din mediul de fermentație, este necesară o clarificare avansată a acestuia pentru a ușura prelucrarea ulterioară.

Izolarea L-lizinei din mediul de fermentație perfect limpede, rezultat în urma filtrării, se realizează prin: reținerea pe coloana de schimbători de ioni, de tip cationit puternic acid; eluare cu soluție de amoniac; concentrare până la îndepărtarea totală a amoniacului; tratare cu acid clorhidric concentrat pentru a transforma L-lizina în monoclorhidrat; concentrare în continuare până la apariția cristalelor. Perfectarea cristalizării se face cu alcool etilic 96%. După recristalizare, din soluția apoasă în prezența alcoolului etilic se obține produsul finit cu conținut de minimum 98% L-lizină. Schema operațiilor principale poate fi urmărită în fig. 9.7 iar schema tehnologică în fig. 9.8.

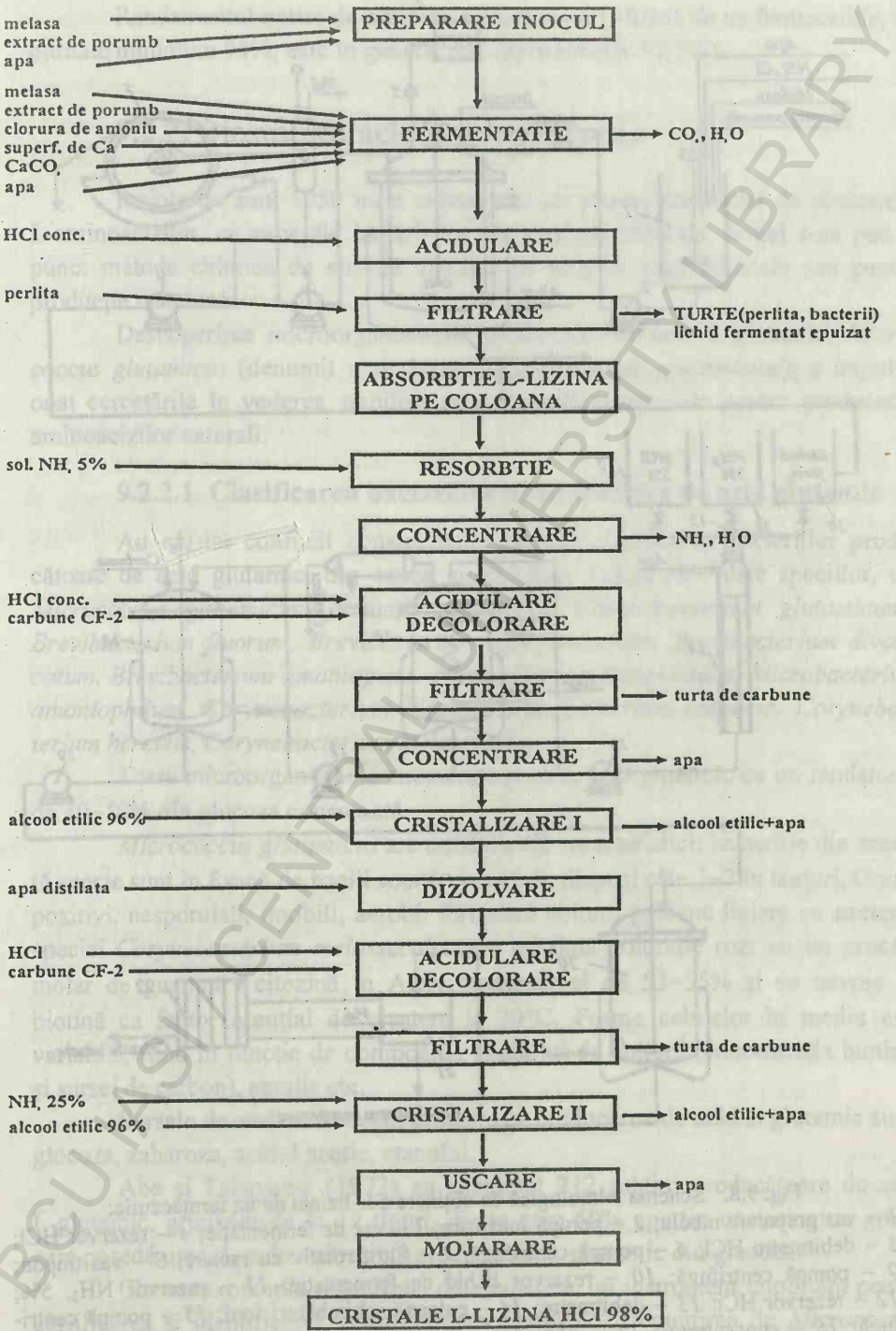


Fig. 9.7. Schema operațiilor principale.

BCU "ASTRA" CENTRUL UNIVERSITAR LIBRARY

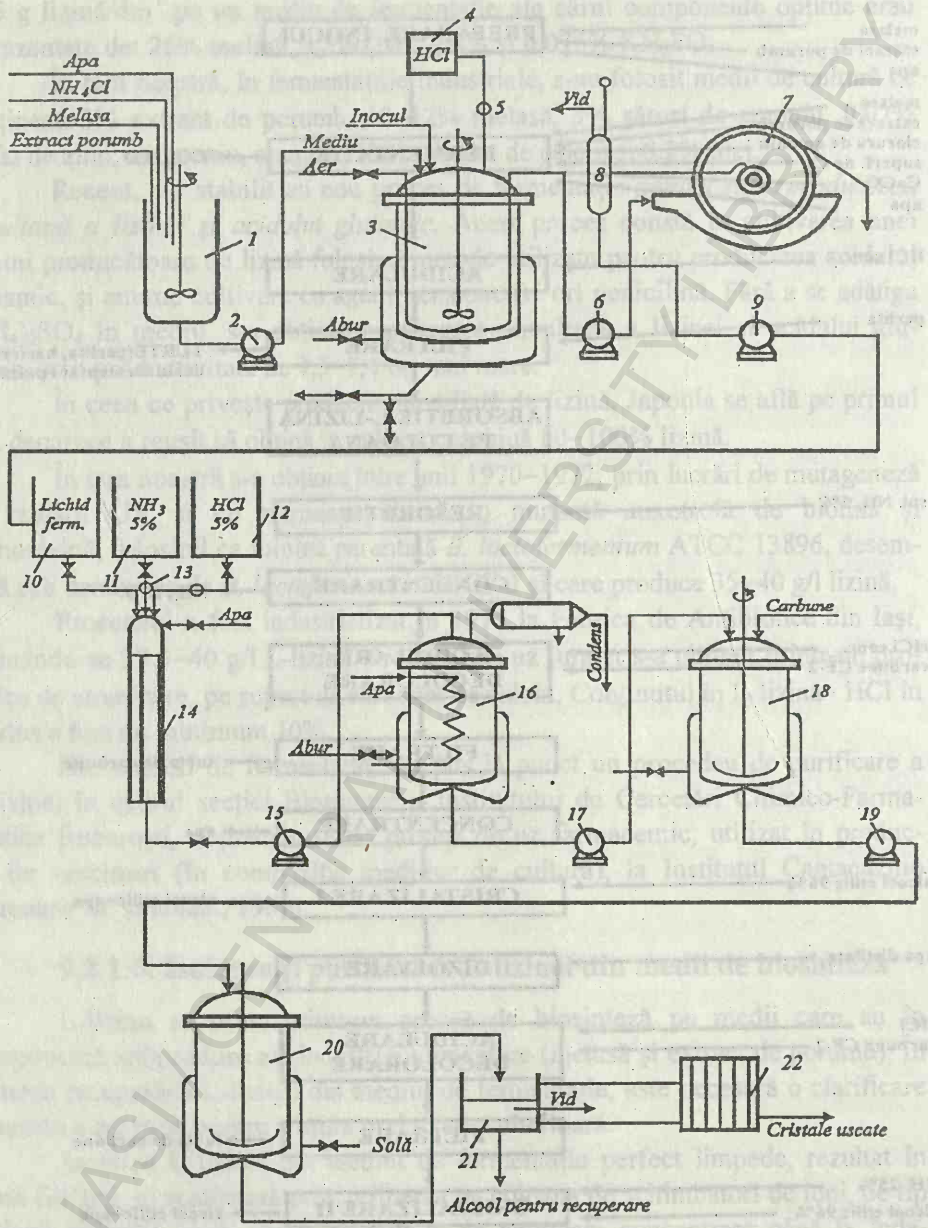


Fig. 9.8. Schema tehnologică de obținere a L-lizinei de uz farmaceutic:
1 – vas preparare mediu; *2* – pompă încărcare; *3* – vas de fermentație; *4* – rezervor HCl; *5* – debitmetru HCl; *6* – pompă centrifugă; *7* – filtru rotativ cu raclare; *8* – vas tmpon; *9* – pompă centrifugă; *10* – rezervor lichid de fermentație; *11* – rezervor NH_3, 5%; *12* – rezervor HCl; *13* – debitmetre; *14* – coloană schimbători ioni; *15* – pompă centrifugă; *16* – concentrator; *17* – pompă; *18* – vas dizolvare și purificare; *19* – pompă; *20* – cristalizator; *21* – filtru Nutsche; *22* – uscător.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Randamentul optim de obținere a produsului L-lizină de uz farmaceutic, de puritate minimum 98%, este în general mic (aproximativ 52,5%).

9.2.2. Biosinteza acidului L-glutamic

Înainte de anul 1950 nu a existat nici un proces comercial de obținere a L-aminoacizilor, cu excepția izolării lor din produse naturale. Inițial s-au pus la punct metode chimice de sinteză utilizate în scopuri experimentale sau pentru producție restrânsă.

Descoperirea microorganismului producător de acid L-glutamic, *Micrococcus glutamicus* (denumit mai târziu *Corynebaterium glutamicum*), a impulsionat cercetările în vederea stabilirii unor metode comerciale pentru producerea aminoacizilor naturali.

9.2.2.1. Clasificarea bacteriilor producătoare de acid glutamic

Au existat confuzii considerabile privind clasificarea bacteriilor producătoare de acid glutamic, din cauza multitudinii denumirilor date speciilor, ca: *Micrococcus glutamicus* (denumit mai târziu *Corynebacterium glutamicum*), *Brevibacterium fluorum, Brevibacterium lactofermentum, Brevibacterium divaricatum, Brevibacterium amoniogene, Brevibacterium thiogenitalis, Microbacterium amoniophilum, Corynebacterium lilium, Corynebacterium callunae, Corynebacterium herculis, Corynebacterium melassecola.*

Toate microorganismele enumerate produc acid glutamic cu un randament de 30–50% din glucoza consumată.

Micrococcus glutamicus are următoarele caracteristici: bacteriile din această specie sunt în formă de bacili scurți, cocoidali, dispuși câte 3–7 în lanțuri, Gram-pozitivi, nesporulați, imobili, aerobi; formează colonii galbene liniare cu excepția speciei *Corynebacterium melassecola* care prezintă coloratie roz; au un procent molar de guanină + citozină în ADN cromosomal de 53–55% și au nevoie de biotină ca factor esențial de creștere la 30°C. Forma celulelor în mediu este variabilă, fiind în funcție de compoziția mediului de cultură (concentrația biotinei și sursei de carbon), aerație etc.

Sursele de carbon frecvent utilizate în producerea de acid L-glutamic sunt: glucoza, zaharoza, acidul acetic, etanolul.

Abe și Takayama (1972) au examinat 212 tulpini producătoare de acid L-glutamic, grupându-le în 12 tipuri, dintre care 60% aparțin unei singure grupe care posedă urează, reduc nitrații și produc acid L-glutamic din glucoză.

Chemotaxonomia reprezintă, de asemenea, un instrument important pentru clasificarea și identificarea acestor microorganisme. Denumirea de *Micrococcus glutamicus*, la care este prezent acidul mezodiaminopimelic în peretele celular, a

fost schimbată în *Corynebacterium.* Tulpinile de *Corynebacterium* au fost incluse în 13 grupuri şi definite drept "*Corynebacterium sensum stricto*" şi anume cele care conţin în peretele celular acid mezodiaminopimelic, arabinoză, galactoză, acid micotic (22–38 atomi de carbon în lanţ), MK-8 sau MK-9 ca menakinonă majoră şi 51–59% molar de *G + C* în ADN. Această definiţie este comparabilă cu clasificarea propusă de Yamada şi Kamagata pentru bacteriile aparţinând grupului T de *Corynebacterium*, evidenţiindu-se de asemenea o bună omologie ADN .

În concluzie, pe baza datelor de taxonomie convenţională, chemotaxonomie şi omologie ADN, se poate considera că tulpinile producătoare de acid glutamic pot fi incluse într-o singură specie a genului *Corynebacterium.*

9.2.2.2. Metabolismul glucidelor

Bacteriile producătoare de acid L glutamic au de obicei formă de bastonaşe şi tind spre o formă de V în timpul diviziunii. Dacă tulpinile sunt cultivate pe un mediu bogat, nu se observă un pleomorfism accentuat. Alungirea, creşterea şi ramificarea are loc frecvent când bacteria este cultivată în mediu cu concentraţie mică de biotină şi în prezenţa unui antibiotic.

Corynebacterium glutamicum asimilează glucoza, fructoza, zaharoza, maltoza şi riboza.

Din studiile efectuate pe acest microorganism s-a stabilit că degradarea glucozei la piruvat poate avea loc atât pe calea Embden Meyerhof Parnas (EMP) cât şi prin şuntul hexozomonofosfaţilor (HMP). În cazul HMP au fost evidenţiate 2 enzime cheie ale şuntului şi anume: glucozo 6-fosfat dehidrogenaza şi 6-fosfogluconat dehidrogenaza, ambele dependente de NADP. Tulpina asimilează concentraţii ridicate de acid L-glutamic din glucoză sau D-riboză, ceea ce demonstrează că această cale este operativă. Enzimele căii EMP au fost identificate la *B. flavum* şi anume: hexokinaza, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, triozofosfat izomeraza, fosfogliceratkinaza, enolaza, fosfogliceromutaza şi piruvatkinaza.

În condiţiile de aerare predomină şuntul HMP, favorizând acumularea glutamatului. În condiţiile anaerobe predomină calea EMP, ceea ce duce la acumularea acidului lactic. De aceea, echilibrul dintre condiţiile aerobe şi cele anaerobe este unul dintre factorii importanţi care controlează producţia glutamatului.

În ceea ce priveşte calea de la compuşii C3 la ciclul acizilor tricarboxilici (TCA), studii folosind carbonul marcat radioactiv au demonstrat pentru *Corynebacterium glutamicum* că $^{13}CO_2$ a fost fixat în poziţia C1 a glutamatului, în prezenţa piruvatului şi a enzimei malice NADP specifice care, probabil, participă la fixarea CO_2. Prezenţa fosfoenolpiruvat (PEP) carboxilază (fig.9.9) s-a demonstrat a avea un rol cheie în intrarea compuşilor C3 în ciclul TCA. PEP-carboxilaza este supusă inhibiţiei feed-back severe prin acid aspartic, dar este activată de fructozo-1,6-difosfat sau acetil CoA. Inhibiţia este înlăturată de acetil CoA.

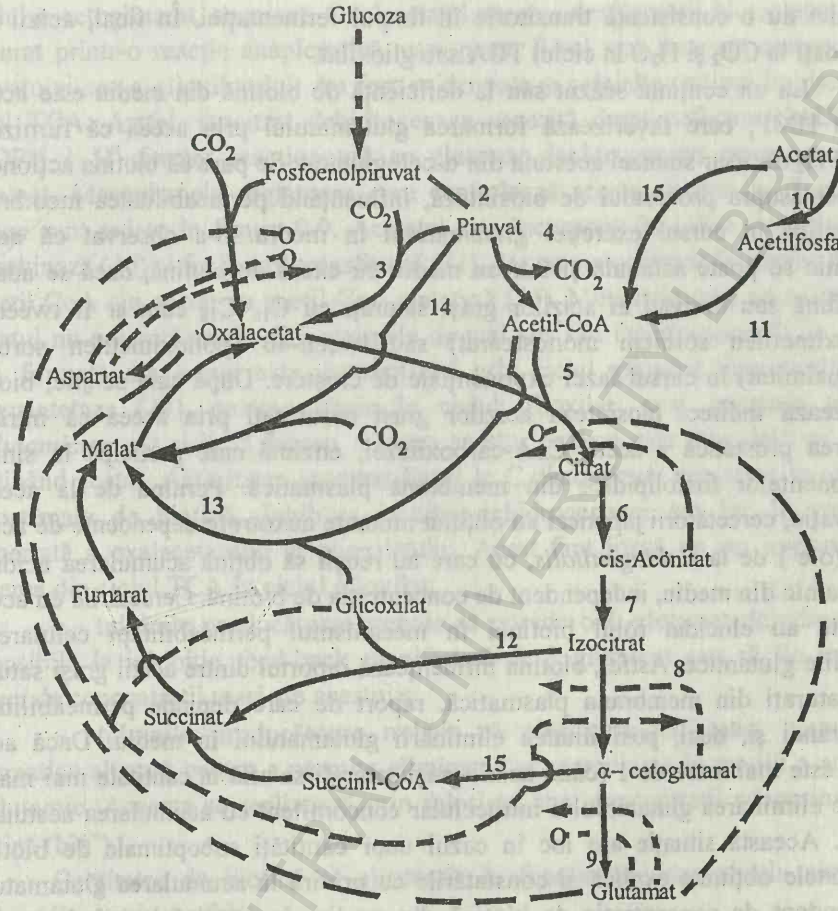


Fig.9.9. Calea de biosinteză a acidului L-glutamic:

1 – fosfoenol-piruvat carboxilaza; *2* – piruvat kinaza; *3* – piruvat carboxilaza; *4* – piruvat dehidrogenaza; *5* – citrat sintaza; *6*; *7* – aconitaza; *8* – izocitrat dehidrogenaza; *9* – glutamat dehidrogenaza; *10* – acetatkinaza; *11* – fosfat acetil transferaza; *12* – izocitrat liaza; *13* – malat sintetaza; *14* – enzima malică; *15* – α-cetoglutarat dehidrogenaza; → inhibiție; ····· O represie (după Shiio și Sugimoto,1981).

9.2.2.3. Rolul biotinei în biosinteza acidului L-glutamic

Alt factor care influențează biosinteza glutamatului este conținutul de biotină din mediu. Astfel, la un conținut maxim de biotină, glutamatul sintetizat nu este excretat în mediu și se acumulează intracelular. Prezența unei concentrații ridicate de glutamat din celulă inhibă direct sau indirect citrat sintetaza, conducând la o creștere intracelulară a aspartatului. Ca urmare este inhibată PEP carboxilaza, se acumulează piruvatul care este convertit la lactat sau succinat. Acești acizi

organici au o consistență tranzitorie în timpul fermentației. În final, acizii sunt degradați la CO_2 și H_2O în ciclul TCA sau glioxilat.

La un conținut scăzut sau la deficiență de biotină din mediu este activat șuntul HMP, care favorizează formarea glutamatului prin aceea că furnizează $NADPH_2$ necesar sintezei acestuia din α-cetoglutarat. Se pare că biotina acționează indirect asupra procesului de biosinteză, influențând permeabilitatea membranei plasmatice în cursul excreției glutamatului în mediu. S-a observat că acidul glutamic se poate acumula și într-un mediu cu exces de biotină, dacă se adaugă penicilină sau derivați ai acizilor grași saturați cu C_{16}–C_{18} cum ar fi tween-60 (polioximetilen sorbitan monostearat) sau tween-40 (polioximetilen sorbitan monopalmitat) în cursul fazei exponențiale de creștere. După cum se știe, biotina catalizează indirect biosinteza acizilor grași nesaturați prin aceea că intră în gruparea prostetică a acetil CoA-carboxilazei, enzimă care participă la sinteza componentelor fosfolipidice din membrana plasmatică. Pornind de la această observație, cercetătorii japonezi au obținut mutante auxotrofe dependente de acidul oleic (ole^-) de la *B.thiogenitalis*, cu care au reușit să obțină acumularea acidului L-glutamic din mediu, independent de concentrația de biotină. Cercetările cu aceste mutante au elucidat rolul biotinei în mecanismul permeabilității celulare la bacteriile glutamice. Astfel, biotina influențează raportul dintre acizii grași saturați și nesaturați din membrana plasmatică, raport de care depinde permeabilitatea membranei și, deci, posibilitatea eliminării glutamatului în mediu. Dacă acest raport este mai mare de 1 (când acizii grași saturați se află în cantitate mai mare), are loc eliminarea glutamatului intracelular concomitent cu acumularea acstuia în mediu. Această situație are loc în cazul unor cantități suboptimale de biotină. Rezultatele obținute explică și constatările cu privire la acumularea glutamatului independent de concentrația de biotină din mediu, în cazul folosirii derivaților acizilor grași saturați. Aceștia modifică echilibrul dintre acizii grași saturați și cei nesaturați și, respectiv, a fosfolipidelor din membrana plasmatică, prin faptul că inhibă activitatea acetil CoA-carboxilazei, enzimă implicată, în principal, în sinteza acizilor grași nesaturați. Ca urmare, raportul acizi grași saturați/acizi grași nesaturați va fi mai mare decât 1. Adăugarea penicilinei în faza *lag* de creștere inhibă sinteza peretelui celular, iar membrana celulară va fi supusă variațiilor de presiune osmotică, ceea ce are drept rezultat modificarea permeabilității acesteia, deci posibilitatea acumulării extracelulare a glutamatului.

Reglarea biosintezei acidului L-glutamic. Biosinteza acidului L-glutamic a fost studiată în fermentați cu o tulpină de *Bacterium flavum*, care trebuie să întrunească următoarele caracteristici pentru exprimarea întregului potențial productiv:

– tulpinile producătoare trebuie să aibă o activitate scăzută sau să fie lipsite de α-cetoglutarat dehidrogenază, pentru ca acidul α-cetoglutaric sintetizat să nu poată fi transformat în acid succinic, ci să fie aminat la glutamat de către glutamat dehidrogenază. Prin aceasta, însă, are loc o inhibiție a ciclului TCA la

nivelul α-cetoglutarat, succinat. Oxalacetatul necesar desfăşurării biosintezei va fi procurat printr-o reacţie anaplerotică, care poate fi cel mai frecvent carboxilarea piruvatului sau a glioxilatului. Au fost evidenţiate şi celelalte enzime implicate în ciclul TCA. Astfel, izocitrat dehidrogenaza necesită drept cofactor NADP, iar $NADPH + H^+$ format reacţionează cu glutamat dehidrogenaza pentru a forma glutamat. Mecanismele reglatoare care controlează aceste enzime la *Bacterium flavum* sunt redate în figura 9.9. Acetatul este încorporat în acetil CoA de către acetatkinază (*10*) şi fosfacetil transferază (*11*), dar nu s-a observat formarea directă a acetil CoA din acetat cu acetil CoA sintetază (*15*). Mutantele care nu asimilează acetatul nu prezintă unele din enzimele de mai sus sau izocitratliaza (*12*). Acetil CoA formată din acetat este metabolizată prin ciclul glioxilat. Izocitratliaza şi malatsintetaza (*13*), enzime cheie în ciclul glioxilat, sunt prezente atât la *C.glutamicum* cât şi la *B.flavum.* Sinteza acestor enzime este stimulată pe medii conţinând acetat. Activitatea izocitrat-liazei la *C.glutamicum* descreşte în condiţii suboptimale de biotină. Inhibiţia izocitrat-dehidrogenazei are loc în prezenţa concertată a oxalacetatului şi glioxilatului. Acest fapt joacă un rol important în trecerea din ciclul TCA în ciclul glioxilat;

– tulpinile producătoare trebuie să posede o L-glutamat dehidrogenază insensibilă la inhibiţia feed-back manifestată de L-glutamat sau să fie inhibată *numai* de concentraţii mari ale acestuia;

– tulpinile producătoare trebuie să aibă permeabilitatea membranei plasmatice alterată pentru a permite eliminarea şi acumularea în mediu a acidului L-glutamic. Aceasta se realizează prin folosirea unei concentraţii suboptimale de biotină (bio^-).

Cantitatea de biotină se ajustează, în funcţie de concentraţia sursei de carbon din mediu, astfel:

– 1,5–2,0 μg/l, pentru 5 % zaharoză (sau alt glucid);
– 2,0–3,0 μg/l, pentru 10% zahroză (sau alt glucid);
– 4,0–8,0 μg/l, pentru 15% zahroză (sau alt glucid);
– 7,0–10,0 μg/l, pentru 20 % zahroză (sau alt glucid).

Independent de concentraţia de biotină din mediu, acumularea acidului L-glutamic se poate obţine prin adaos de penicilină sau derivaţi ai acizilor graşi saturaţi, sau prin folosirea mutantelor auxotrofe de acid oleic (ole^-).

9.2.2.4. Producerea industrială a acidului L-glutamic

Mediul de cultură pentru producerea industrială a acidului L-glutamic trebuie să conţină o sursă de carbon, reprezentată de obicei de glucoză în concentraţii de 10–12 %; o sursă de azot reprezentată de săruri de amoniu, uree, extract de porumb, hidrolizat de soia, săruri de Ca, K, Mg, ale anionilor SO_4^{2-} şi PO_4^{3-}; metalelor Fe, Zn, Mn, Co, trebuie să fie sub formă de urme, ca şi biotina.

În prezent, în locul glucozei tehnice ce foloseşte melasa ca sursă de carbon sau un amestec de glucoză, fructoză şi zaharoză, care dau rezultate mai bune decât glucoza pură. Aceasta se datorează prezenţei în melasă a acizilor organici.

*p*H-ul se ajustează la 6,8–7 şi apoi mediul steril se inoculează cu o cultură de 10–15 ore într-un raport de 5–10 %. În cursul desfăşurării procesului, temperatura se menţine la 31°C, cu o bună aerare, iar *p*H-ul se menţine între valorile 6,0 şi 7,5 cu NH_4OH, care se adaugă continuu, în scopul orientării echilibrului în favoarea aminării reductive a acidului α-cetoglutaric. În aceste condiţii, procesul decurge în două faze. În prima fază (8–12 h) are loc multiplicarea microorganismului, în cea de-a doua fază are loc acumularea acidului L-glutamic, procesul fiind încheiat în 30–35 de ore. La o concentraţie de 100 g/l sursă de carbon, se obţin 50–60 g/l acid L-glutamic.

Aeraţia bună reprezintă un factor foarte important în desfăşurarea procesului cu randament de transformare ridicat.

Producerea de glutamat pe bază de etanol ca sursă de carbon s-a realizat cu specii de *Brevibacterium*, obţinându-se randamente de 60 g/l glutamat.

Tulpinile care folosesc etanolul necesită biotină ca factor de creştere şi răspund la limitarea concentraţiei de biotină în mod similar cu tulpinile care folosesc glucidele ca sursă de carbon.

Producerea de glutamat pe bază de *n*-parafine s-a realizat cu o tulpină auxotrofă de glicerol, *C.alkanolyticum*, obţinându-se 40 g/l glutamat.

În România s-a pus la punct un procedeu de biosinteză a glutamatului. Prin lucrări de mutageneză cu radiaţii γ, folosind ca tulpină parentală *Brevibacterium lactofermentum*, s-a obţinut o mutantă care produce pe un mediu standardizat (glucoză 10–12 %, extract de porumb 0,3 % ca substanţă uscată; uree 2–3 %, fosfaţi mono- şi bipotasic câte 0,1 respectiv 0,15%, sulfat de magneziu 0,05 %) – 60–70 g/l glutamat, în condiţii de aeraţie puternică. Timpul de fermentaţie este de 30–36 h.

9.2.2.5. Utilizarea acidului glutamic

Acidul L-glutamic se foloseşte în medicină la tratarea bolilor sistemului nervos, deoarece întreţine şi ameliorează metabolismul creierului. S-a folosit la tratarea schizofreniei, epilepsiei, a urmărilor meningitei, encefalitei, poliomielitei. Întreţine nivelul de oxigenare a ţesutului cerebral. Se presupune că acidul L-glutamic absoarbe amoniacul format în ţesuturi transformându-l în glutamină, îndepărtând astfel fenomenul de oboseală şi intoxicaţie.

În industria alimentară se foloseşte drept condiment pentru ameliorarea gustului conservelor din carne, peşte şi legume. Adăugarea în cantitate de 0,1–0,5%, raportat la greutatea produselor, contribuie la accentuarea gustului natural al produselor alimentare, făcându-le mai plăcute.

În zootehnie este introdus în hrana suinelor.

9.3. BIOSINTEZA ANTIBIOTICELOR

Antibioticele reprezintă probabil cele mai importante produse comerciale obținute prin biosinteză și sunt substanțe chimice produse de microorganisme, care omoară sau inhibă creșterea altor microorganisme. Antibioticele folosite ca agenți în combaterea maladiilor infecțioase au produs un impact deosebit asupra practicii medicale, neputând fi comparate cu nici un alt produs terapeutic existent până în prezent.

Antibioticele sunt produși ai metabolismului secundar. Deși potențialul de biosinteză al tulpinilor este relativ scăzut, în majoritatea cazurilor ele sunt produse prin fermentații microbiene datorită activității lor terapeutice și valorii lor economice crescute.

Inițial, antibioticele comercializate au fost produse de fungi filamentoși și bacterii din grupa actinomicetelor. Lista celor mai importante antibiotice este dată în tabelul 9.1.

Tabelul 9.1

Câteva antibiotice produse comercial

Antibioticul	Microorganismul producător	Tipul de microorganism
Bacitracină	*Bacillus licheniformis*	Bacterii sporulate
Cefalosporină	*Cephalosporium sp.*	Fungi
Cloramfenicol	Sinteză chimică (obținut la început cu *Streptomyces venezuelae*)	
Cicloheximidă	*Streptomyces griseus*	Actinomicete
Cicloserină	*S.orchidaceus*	Actinomicete
Eritromicină	*S.erythreus*	Actinomicete
Griseofulvină	*Penicillium griseofulvina*	Fungi
Kanamicină	*S.kanamyceticus*	Actinomicete
Lincomicină	*S. lincolnensis*	Actinomicete
Neomicină	*S.fradiae*	Actinomicete
Nistatină	*S.noursei*	Actinomicete
Penicilină	*Penicillium chrysogenum*	Fungi
Polimixină B	*Bacillus polymyxa*	Bacterii sporulate
Streptomicină	*S.griseus*	Actinomicete
Tetraciclină	*S.rimosus*	Actinomicete

Întrucât, frecvent, antibioticele sunt înrudite din punct de vedere chimic, sunt cunoscute diverse familii de antibiotice. Ca urmare, antibioticele pot fi clasificate după structura lor chimică (tabelul 9.2), care oferă posibilitatea formării unor grupe, ce elucidează legătura dintre constituția chimică și proprietățile antibacteriene.

Tabelul 9.2

Clasificarea antibioticelor în funcție de structura lor chimică

Antibiotice conținând glucide	
Aminoglicozide:	Streptomicina
N-Glicozide:	Streptotricina
C-Glicozide:	Vancomicina
Glicolipide:	Moenomicina
Lactone macrociclice	
Macrolide:	Eritromicina
Poliene:	Candicidina
Quinone	
Tetracicline:	Tetraciclina
Antracicline:	Adriamicin
Naftochinone:	Actinorhodin
Benzochinone:	Mitomicin
Aminoacizi și peptide	
Derivați de aminoacizi:	Cicloserine
Antibiotice β-lactam:	Penicilinele
Peptide:	Bacitracina
Cromopeptide:	Actinomicina
Peptide chelatate:	Bleomicina
Antibiotice heterociclice conținând azot	
Antibiotice nucleosidice:	Polyoxine
Antibiotice conținând oxigen	
Antibiotice polieter:	Monensin
Derivați alifatici	
Derivați cicloalcanici:	Cicloheximida
Antibiotice steroidice:	Cicloheximida
Antibiotice aromatice	
Derivați benzenici:	Cloramfenicolul
Derivați cu nucleu aromatic condensat:	Griseofulvina
Eteri aromatici:	Novobiocina
Quinolone	
4-Quinolona:	Acid nalidixic
Fluoro 4-quinolona:	Norfloxacina

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Clasificarea după biogeneză permite explicarea mai uşoară a mecanismului biochimic de formare a antibioticelor. Se deosebesc astfel:

– antibiotice derivate din aminoacizi:cloramfenicol, penicilină, bacitracine, actinomicine;

– antibioticile derivate total sau parţial din glucide simple: streptomicină, kanamicină, neomicină;

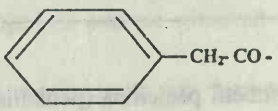
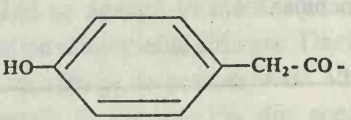
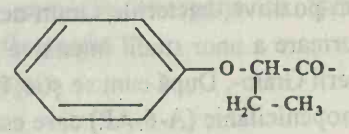
– antibiotice diverse: novobiocină, vancomicină.

9.3.1. Antibioticele cu nucleu β- lactam şi cefalosporinele

Cele mai importante antibiotice din punct de vedere istoric şi medical sunt antibioticele cu nucleu β-lactam, care includ: penicilinele, cefalosporinele şi cefamicinele, toate importante din punct de vedere medical. Se numesc antibiotice β-lactam deoarece conţin un nucleu β-lactam, structura chimică fiind prezentată în tabelul 9.3.

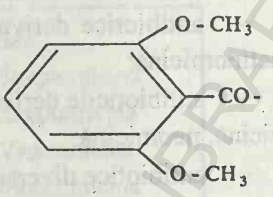
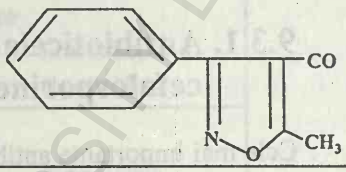
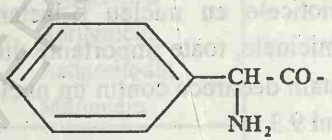
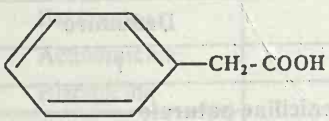
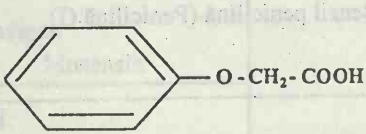
Tabelul 9.3

Structura unor peniciline naturale, de biosinteză şi de semisinteză.

Denumire	Radicali N-acil
1	2
1. Peniciline naturale	
Benzil penicilină (Penicilină G)	
Hidroxibenzilpenicilină	
2. Peniciline semisintetice	
Propicilină (stabilă faţă de acizi; sensibilă faţă de β-lactamază)	

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 9.3 (continuare)

1	2
Meticilină (stabilă față de acizi; rezistentă la β-lactamază)	
Oxaciclină (stabilă față de acizi; rezistentă la β-lactamază)	
Ampicilină, cu spectru larg de acțiune, în special față de germenii Gram-	
3. Peniciline de biosinteză	
Benzil penicilină (Penicilină G) stabilă în mediu acid, sensibilă la β-lactamază slab activă față de germenii Gram-	 Acid fenil acetic
Fenoximetil penicilină (penicilina V) stabilă în mediu acid, celelalte proprietăți fiind identice cu penicilina G	 Acid fenoxiacetic

9.3.2. Tipurile de peniciline

Primul antibiotic descoperit a fost penicilina G activă față de bacteriile Gram-pozitive, bacteriile Gram-negative neputând fi penetrate de acest antibiotic. Ca urmare a unor studii intensive au fost descoperite noi peniciline active față de bacterii Gram-. După cum se știe, în structura de bază a penicilinelor intră acidul 6-aminopenicilanic (A-6-AP) care este format dintr-un inel tiazolidinic, condensat cu un inel β-lactam.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La acidul 6- aminopenicilanic se ataşează diferite catene laterale în poziţia *6*. Penicilinele naturale se formează în fermentaţii fără adaos de precursor. Fermentaţiile pot fi controlate riguros numai prin adăugarea în mediu a catenei laterale ca precursor, pentru a produce penicilina dorită. Pe această cale au fost obţinute peste 100 de peniciline de biosinteză. Dintre acestea numai penicilinele G şi V sunt obţinute în scopuri comerciale.

Pentru producerea industrială a unor peniciline active faţă de bacteriile Gram- s-a folosit o combinaţie dintre procesul fermentativ şi chimic care a condus la obţinerea de peniciline de semisinteză. Materialul de pornire pentru producerea prin semisinteză a penicilinelor este penicilina G, care serveşte ca sursă de A6AP. Penicilina G este scindată chimic sau enzimatic (folosind penicilinacilaza), iar A6AP obţinut este condensat chimic la o altă catenă laterală. Penicilinele de semisinteză au îmbunătăţit semnificativ proprietăţile terapeutice ale acestora.

Producţia antibioticelor cu structură β-LACTAM. Producerea penicilinei este un proces puternic aerob, fiind necesară o aeraţie eficientă. Penicilina este un metabolit secundar tipic. În timpul fazei de creştere se produc cantităţi foarte mici de penicilină, dar, îndată ce sursa de carbon este epuizată, începe faza de producere a penicilinei, care poate fi extinsă până la câteva zile, prin adaos de diferite componente din mediul de cultură.

Unele medii permit randamente ridicate în penicilină, în timp ce altele sunt eficiente în obţinerea de biomasă, concomitent cu o acumulare scăzută de metabolit.

Materia primă de bază care permite randamente ridicate pentru majoritatea penicilinelor este extractul de porumb (corn steep liquer). Acest component serveşte ca sursă de azot şi factor de creştere. Sursa de carbon este, în general, lactoza, a cărei viteză de consum este mai mică în comparaţie cu cea de glucoză şi nu induce represie catabolică.

Se poate folosi şi glucoza ca sursă de carbon, dar în acest caz fermentaţia va fi alimentată cu glucoză treptat, pentru a evita represia catabolică. Catena laterală a penicilinei G este radicalul fenil şi, când se adaugă în mediu (în mod continuu) acid fenoxiacetic ca precursor, se pot obţine randamente ridicate. Dacă se urmăreşte obţinerea altor peniciline în mediu, se va adăuga ca precursor un alt tip de catenă laterală acilată. Penicilina va fi excretată în mediu, 1% din aceasta rămânând ataşată de filamentele fungice. După înlăturarea miceliului prin filtrare, filtratul va fi acidulat, iar antibioticul va fi extras cu acetat de amil sau acetat de butil. În primii ani de producţie preţul penicilinei era foarte crescut, dar în prezent, când producţia pe scară industrială a devenit rentabilă, se spune că "preţul penicilinei este dat de ambalaj şi nu de conţinutul flaconului".

Tehnologia obţinerii penicilinelor presupune:

- pregătirea mediilor şi sterilizarea lor;
- fermentaţia propriu-zisă;

– filtrarea soluțiilor native;
– separarea și purificarea penicilinelor.

Pregătirea mediilor. Pregătirea mediilor constă în dizolvarea în apă a componentelor mediilor conform rețetei pentru fiecare fază a procesului de fermentație.

Tabelul 9.4

Compoziția mediului de cultură pe faze de fermentație (%)

Compoziția	Inoculator (*i*)	Intermediar (*I*)	Regim (*R*)
Extract de porumb	2	2–3	2,5–2,8
Lactoză	0,5–0,6	3–3,5	6–7
Glucoză	3–3,5	1,2	2–3
Făină de soia			0,3
$CaCO_3$	0,7–0,8	0,7	1,2–1,3
KH_2PO_4	0,7	0,2–0,3	0,5–0,6
NH_4NO_3		0,12	0,3
Na_2SO_4		0,06	0,06
$ZnSO_4$			0,002
$MnSO_4$			0,002
Fenilacetat amidă		0,2	0,7
Tiosulfat de Na		0,016	0,8
Apă		Adaos până la 100 ml	

Pregătirea mediilor și sterilizarea lor pentru inocul (*i*) și intermediar (*I*) se poate realiza direct în fermentatoarele respective. Pregătirea mediilor pentru bioreactorul de regim are loc într-un aparat prevăzut cu un agitator, conductă pentru abur viu necesar încălzirii și serpentină de răcire. În aparat se introduce apa conform rețetei, se încălzește la 60...70 °C, se adaugă extractul de porumb și se fierbe timp de 0,5–1 ore. Soluția se răcește la 60...70°C, iar restul componentelor se adaugă în următoarea ordine: carbonat de calciu, azotat de amoniu, sulfați, fosfat, lactoză, glucoză.

Sterilizarea mediului se realizează pe coloană și în menținător, prin încălzire cu abur direct la 124...126°C și menținere la această temperatură 10–20 min, după care urmează răcirea la 60...65°C și trimiterea acestuia în bioreactorul de regim, unde se continuă răcirea până la temperatura de 27°C – temperatură optimă pentru biosinteză.

Fermentația. Se realizează în 3 trepte – în inoculator (*i*), intermediar (*I*) și în regim (*R*).

În inoculator (*i*) se produce aclimatizarea microorganismelor producătoare de antibiotice, la noile condiții de dezvoltare.

În intermediar (*I*) începe creşterea exponenţială.

În regim (*R*) se continuă creşterea microorganismelor şi se elaborează penicilina.

Eficienţa procesului de biosinteză este determinată de caracteristicile microorganismului producător. Tulpina utilizată *Penicillium chrysogenum*, a cărui capacitate productivă a fost ridicată foarte mult prin procese de mutaţie în trepte, se caracterizează prin:

- rată mare de multiplicare;
- utilizarea rapidă a azotului şi a precursorului;
- lipsa pigmenţilor în biomasă;
- miceliu fibros.

Procesul de fermentaţie cuprinde 3 faze metabolice distincte:

- faza de creştere a microorganismului;
- faza de producere a antibioticului;
- faza autolitică a microorganismului.

Faza de creştere se caracterizează prin acumulare de biomasă micelianã şi utilizarea intensivă a componentelor mediilor de cultură. Glucoza este asimilată rapid atât pentru formarea materialului celular cât şi pentru furnizarea energiei necesare bioprocesului. Necesarul de oxigen este maxim, iar activitatea respiratorie, caracterizată prin degajarea de dioxid de carbon este ridicată.

Faza de producere a penicilinelor se caracterizează prin încetinirea creşterii miceliului, scăderea consumului de oxigen, menţinerea *p*H-ului la valoarea de 6,8–7,5 şi acumularea penicilinei. În această fază lactoza este folosită lent de către miceliu şi furnizează energia necesară proceselor de biosinteză sau pentru formarea constituenţilor celulari.

Faza autolitică este aceea în care microorganismul se epuizează ca urmare a activităţii metabolice prelungite, iar sursele de carbon din mediu sunt consumate. Scade conţinutul în azot al mediului, începe procesul de autoliză cu eliberare de amoniac şi creşte *p*H-ul peste valoarea 8.

Încetează producerea de peniciline şi apare procesul de hidroliză alcalină a penicilinelor formate.

În practica industrială nu este permisă prelungirea fermentaţiei până la faza de autoliză.

Cantitatea de peniciline formate este rezultatul îmbinării următorilor factori:

- potenţialul productiv al tulpinii;
- folosirea unor constituenţi adecvaţi în mediu şi un echilibru corect în proporţiile acestora;
- menţinerea *p*H-ului optim;
- un raport corect între diferitele surse de carbon;

– adăugarea de precursori care vor decide natura catenei laterale şi tipul de penicilină produsă;
– asigurarea necesităţilor în substanţe minerale;
– menţinerea temperaturii optime.

Din datele existente în literatura de specialitate se poate concluziona că *p*H-ul afectează:
– vitezele reacţiilor enzimatice;
– permeabilitatea membranei celulare;
– gradul de ionizare a sărurilor.

Pentru faza de creştere a biomasei, *p*H-ul optim este de 4,5–5,0, iar pentru biosinteză este de 7,0–7,5. Peste *p*H=7,5 începe procesul de autoliză însoţit de degradarea penicilinei.

Temperatura optimă este de 25°C.

Aerul necesar este de 1–1,5 l mediu /min. Cinetica fermentaţiei este redată în figura 9.10.

Compoziţia mediului de cultură este hotărâtoare pentru că microorganismele au nevoie pentru dezvoltarea lor de surse de glucide, azot, substanţe minerale şi precursori.

Sursele de carbon sunt necesare pentru dezvoltarea microorganismelor şi pentru producerea antibioticelor. Biosinteza unei molecule atât de complexe ca penicilina necesită un flux de energie exterior, procesul fiind endoterm. Prin urmare, biosinteza penicilinelor se poate realiza numai dacă se desfăşoară simultan şi procese de oxidare ale glucidelor, care constituie sursa principală de energie.

Viteza de utilizare a sursei de carbon se înscrie în următoarea schemă: glucoza > acid lactic > lactoză, care confirmă faptul că în faza de creştere a microrganismelor se consumă glucoza, iar în faza de producere a penicilinei se consumă lactoza. Introducerea glucozei sau a lactozei duce la scăderea bruscă a vitezei de creştere a biomasei:

Sursele de azort sunt necesare pentru formarea grupărilor aminice şi pentru obţinerea aminoacizilor. Se utilizează azot mineral din săruri de amoniu şi azot organic furnizat de aminoacizi şi peptide din extractul de porumb.

Substanţele minerale sunt vitale în procesul de creştere deoarece afectează:
– permeabilitatea membranei celulare şi echilibrul ionic;
– activează sistemele enzimatice sau intră în structura sistemelor enzimatice. Astfel KH_2PO_4 oferă K^+ pentru activarea unor sisteme enzimatice, iar PO_4^{3-} este necesar pentru fosforilare.

Controlul fermentaţiei se realizează prin determinarea:
– sterilităţii mediului;
– gradului de dezvoltare morfologică a producătorului;
– *p*H-ului mediului;
– concentraţiei de penicilină din mediul de cultură;
– consumului de glucide.

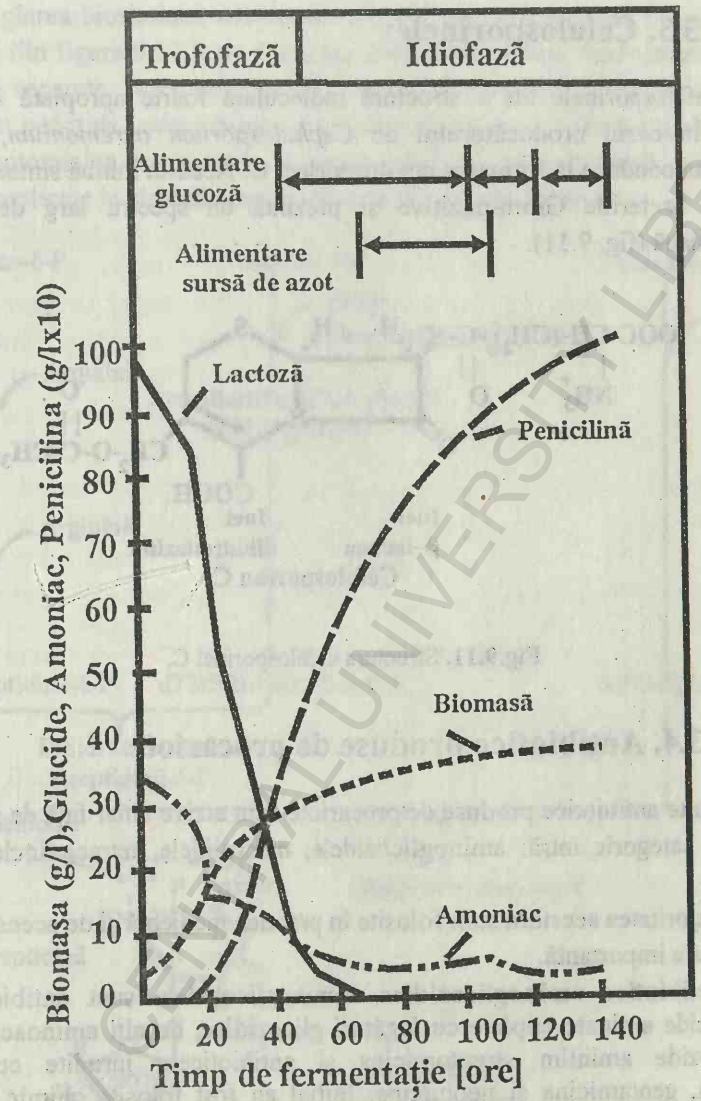


Fig.9.10. Cinetica formării penicilinei cu *Penicillium chrysogenum.*

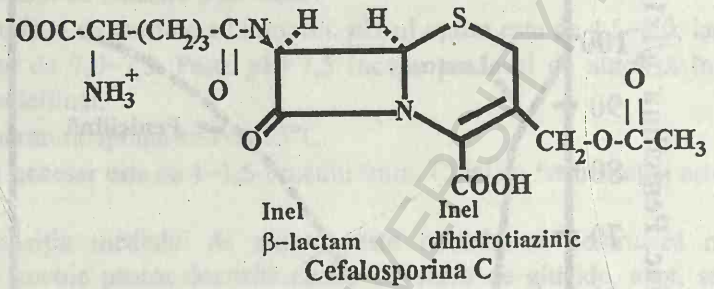
Probele se iau la interval de 4 ore, iar procesul se consideră terminat atunci când conținutul în sursă de carbon al mediului ajunge la 0,2–0,6 %, iar concentrația soluției rămâne practic constantă între două determinări.

Concentrația penicilinelor în soluția nativă depinde de potențialul productiv al tulpinii și de respectarea condițiilor optime de fermentație.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9.3 3. Cefalosporinele

Cefalosporinele au o structură moleculară foarte apropiată de a penicilinelor. În cazul producătorului de *Cephalosporium acremonium*, ciclizarea tripeptidului conduce la formarea cefalosporinei C. Aceasta inhibă sinteza peretelui celular la bacteriile Gram-pozitive şi prezintă un spectru larg de activitate antimicrobiană (fig. 9.11).



Cefalosporina C

Fig.9.11. Structura cefalosporinei C.

9.3.4. Antibiotice produse de procariote

Multe antibiotice produse de procariote sunt active chiar faţă de procariote. În această categorie intră: aminoglicozidele, macrolidele, tetraciclinele şi multe altele.

Majoritatea acestora sunt folosite în practica medicală şi de aceea producţia lor este foarte importantă.

Antibiotice aminoglicozidice. Aminoglicozidele sunt antibiotice care conţin glucide aminate cuplate cu legături glicozidice, de alţi aminoacizi. Dintre aminoglicozide amintim streptomicina şi antibioticele înrudite cu aceasta, kanamicina, gentamicina şi neomicina. Iniţial au fost folosite chimic împotriva infecţiilor cu bacterii Gram-negative. Streptomicina a fost folosită intensiv în tratamentul tuberculozei. Descoperirea tratamentului tuberculozei cu streptomicină a prezentat un avantaj medical extraordinar în eradicarea acestei maladii înspăimântătoare. Ulterior a fost înlocuită cu o serie de medicamente de sinteză chimică, deoarece streptomicina dă efecte secundare şi induce rezistenţa la microorganisme.

Folosirea aminoglicozidelor în infecţiile cu germeni Gram-pozitivi este redusă, deoarece s-a dezvoltat puternic industria penicilinelor de semisinteză şi cea a tetraciclinelor. În prezent, antibioticele aminoglicozidice sunt considerate antibiotice de rezervă, fiind folosite în medicaţie în lipsa altora.

Reglarea biosintezei streptomicinei prezintă caracteristici deosebite. După cum reiese din figura 9.12, cele 3 nuclee ale streptomicinei sunt sintetizate pe căi metabolice separate. Intermediarul final al metabolismului, streptomicina-P, este inactivă din punct de vedere biologic şi este activată prin înlăturarea moleculei de fosfat. Streptomicina este sintetizată cu un metabolit secundar tipic. Câteva dintre enzimele implicate în sinteză sunt produse la sfârşitul trofofazei.

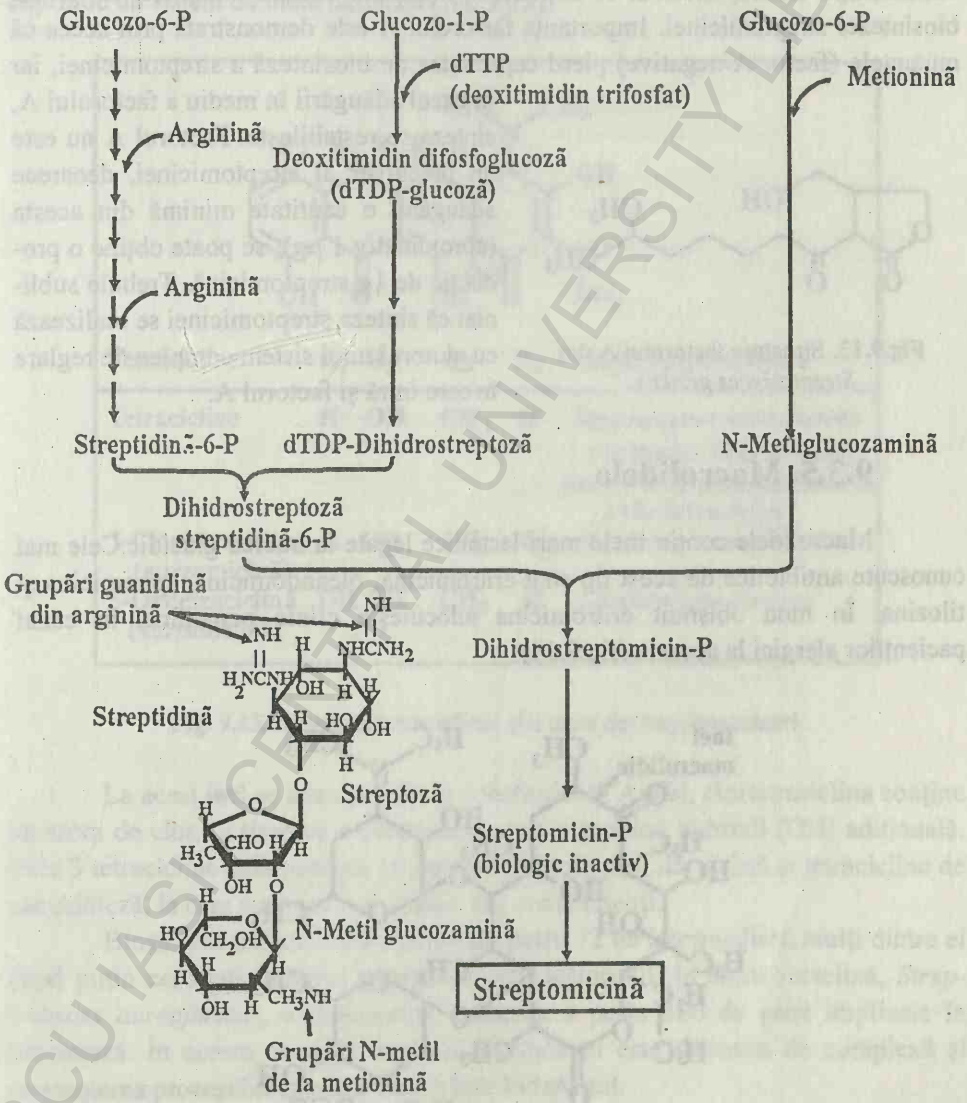


Fig.9.12. Biosinteza streptomicinei cu *Streptomyces griseus*.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unul dintre aspectele privind reglarea implică producerea unui inductor denumit factor A (fig. 9.13). Factorul A nu este înrudit chimic cu streptomicina, dar este implicat în metabolismul glucidelor. Enzimele cheie din calea de biosinteză a streptomicinei nu se sintetizează, până nu este sintetizat factorul A, fapt care evidențiază rolul lui în metabolismul secundar. În timpul fazei de creștere este sintetizat și excretat de mediu factorul A. În momentul în care atinge o concentrație critică, factorul A acționează inducând sinteza enzimelor cheie ale biosintezei streptomicinei. Importanța factorului A este demonstrată prin aceea că mutantele (factor A negative) pierd capacitatea de biosinteză a streptomicinei, iar în cazul adăugării în mediu a factorului A, sinteza se restabilește. Factorul A nu este un precursor al streptomicinei, deoarece adăugând o cantitate minimă din acesta (aproximativ 1 μg), se poate obține o producție de 1g streptomicină. Trebuie subliniat că sinteza streptomicinei se realizează cu ajutorul unui sistem complex de reglare în care intră și factorul A.

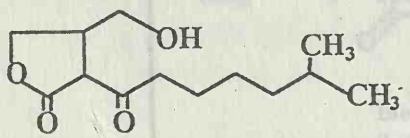


Fig.9.13. Structura factorului A din *Streptomyces griseus*.

9.3.5. Macrolidele

Macrolidele conțin inele mari lactonice legate la nucleu glucidic.Cele mai cunoscute antibiotice de acest tip sunt eritromicina, oleandomicina, spiramicina și tilozina. În mod obișnuit eritromicina înlocuiește clinic penicilina, în cazul pacienților alergici la aceasta (fig.9.14)

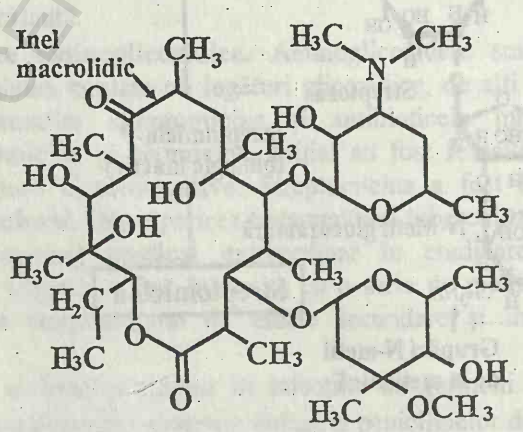
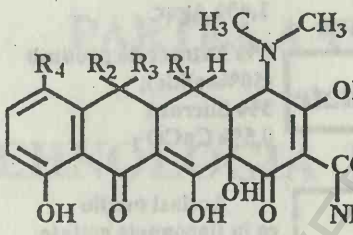


Fig. 9.14. Structura eritromicinei, un antibiotic tip macrolidă, tipic.

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITARA

În sinteza eritromicinei sunt implicate peste 25 de etape enzimatice. Reglarea biosintezei se face pe diverse căi. Astfel are loc inhibiția enzimelor prin glucoză și fosfat, prin eritronolidă B – un intermediar al sintezei și chiar prin produsul final, eritromicină.

Tetraciclinele. Tetraciclinele au un spectru larg de acțiune, inhibând aproape toate bacteriile Gram-negative și Gram-pozitive. Structura de bază cuprinde un sistem de inele naftacen (fig. 9.15).



Tetracicline	R_1	R_2	R_3	R_4	Tulpini producătoare
Tetracicline	H	OH	CH_3	H	*Streptomyces aureofaciens* (în mediu liber de clor) sau prin modificare chimică a clortetraciclinei
7-Clortetraciclină (aureomicină)	H	OH	CH_3	Cl	*Streptomyces aureofaciens*
5-Oxitetraciclină (Terramicină)	OH	OH	CH_3	H	*Streptomyces rimosus*

Fig. 9.15. Structura tetraciclinei și a unor derivați importanți.

La acest inel se adaugă diferiți constituienți. Astfel, clortetraciclina conține un atom de clor, în timp ce oxitetraciclina are o grupare hidroxil (OH) adițională. Cele 3 tetracicline sunt produse pe cale microbiologică, dar există și tetracicline de semisinteză, la care sunt inserați chimic alți constituienți.

Biosinteza tetraciclinelor cuprinde peste 72 de intermediari, mulți dintre ei fiind puțin cercetați. Studiul genetic al producătorului de clortetraciclină, *Streptomyces aureofaciens*, a demonstrat existența a peste 300 de gene implicate în biosinteză. În aceste condiții, reglarea biosintezei este deosebit de complexă și cunoașterea procesului aparține unui viitor îndepărtat.

Represia sintezei clortetraciclinei are loc atât prin glucoză cât și prin fosfat. Represia prin fosfat este foarte importantă, motiv pentru care mediul folosit în fermentație trebuie să conțină concentrații limitate de fosfat. Schema producției clortetraciclinei este arătată în figura 9.16.

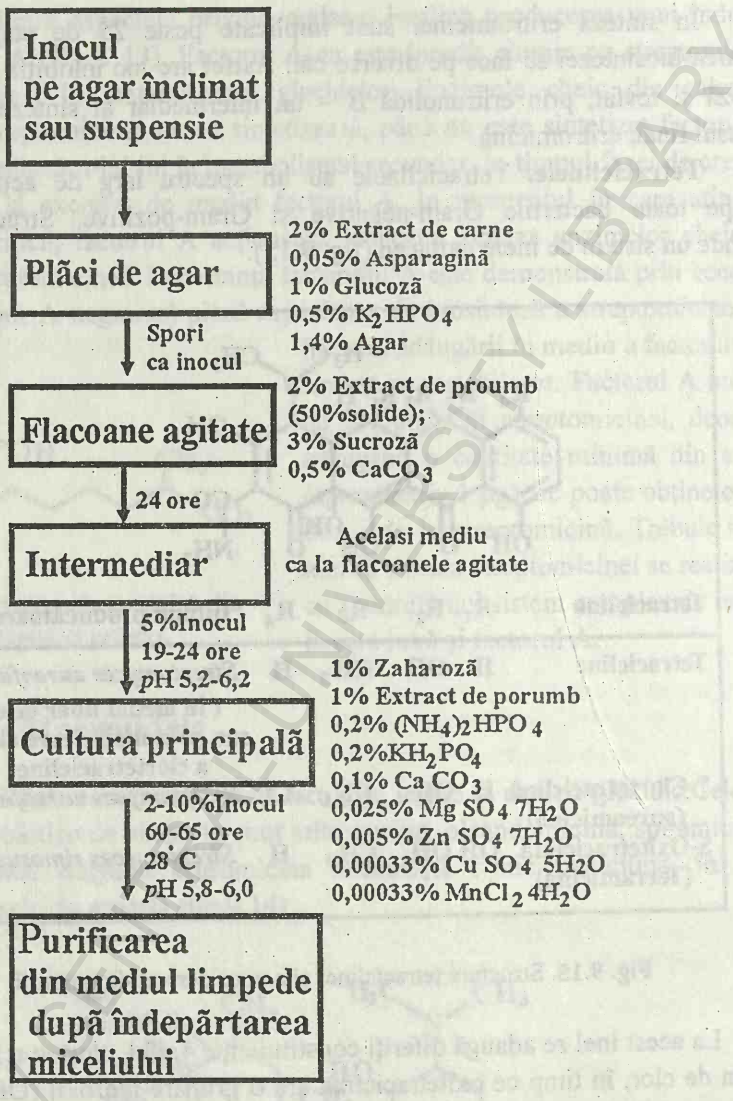


Fig.9.16. Schema de producere a clortetraciclinei cu *Streptomyces aureofaciens*.

BCU IASI UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA A TREIA

BIOTEHNOLOGIA ENZIMELOR

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- GENERALITĂȚI ASUPRA ENZIMELOR DE FERMENTAȚIE
- METODE DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR
- ENZIME AMILOLITICE
- ENZIME CELULOZOLITICE
- ENZIME PROTEOLITICE
- ENZIME PECTOLITICE
- ENZIME LIPOLITICE
- GLUCOZOXIDAZA

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10 ENZIME DE FERMENTAȚIE – GENERALITĂȚI

10.1. SCURT ISTORIC

Enzimele sunt utilizate în practică de mii de ani, înainte ca natura şi rolul lor în reacţii să fie înţelese. Un exemplu în acest sens este obţinerea brânzeturilor cu ajutorul stomacului de viţel. Utilizarea acestui procedeu este atât de veche încât data descoperirii sale a fost uitată. În Orient, preparatele enzimatice brute (koji) obţinute din fungi ce se formau pe suprafaţa orezului alimentar erau folosite de multe sute de ani în conservarea, condimentarea şi modificarea de consistenţă a diferitelor produse alimentare.

Enzimele au fost denumite prima dată cu termenul de "fermenţi", în 1897, când Buchner, prin distrugerea pereţilor celulelor de drojdie obţine un mojarat care catalizează fermentaţia alcoolică şi a demonstrat pentru prima dată că enzimele pot funcţiona independent de celule. În prezent se cunosc aproximativ 3200 de enzime diferite care s-au obţinut în stare pură (prin cristalizare), sau sub formă de preparate cu diferite grade de puritate aproximativ 1000–1500.

Enzimele sunt prezente în toate organismele vii şi se găsesc în toate tipurile de celule animale, în fluidele corporale (sânge, limfă, lichid cefalorahidian, lichid intestinal), în unele secreţii specifice pentru diferite organe (stomac, pancreas, intestin subţire, rinichi etc.), la plante şi în toate virusurile şi microorganismele care populează diferite zone ale Pământului. Numărul şi abundenţa lor depind însă de poziţia pe scara filogenetică a organismului. La plantele şi la animalele superioare, enzimele se găsesc în toate celulele vii ale acestora, însă distribuţia lor variază după natura ţesutului din care fac parte celulele.

La microorganisme, echipamentul enzimatic şi concentraţia diferitelor enzime depind de specia microorganismului şi sunt influenţate, în mare măsură, de condiţiile mediului exterior. În procesul de obţinere a preparatelor enzimatice se folosesc sursele care sunt foarte bogate în enzimele dorite, sunt ieftine, accesibile şi

ROMANIAN UNIVERSITY LIBRARY

se prelucrează uşor. Materiile prime folosite la fabricarea preparatelor enzimatice pot fi de natură vegetală, animală sau microbiană. La plante, concentraţii mari de enzime se pot întâlni în seminţe, în boabe germinate, în fructe, frunze, rădăcini. La animale, enzimele se găsesc însă în cantităţi mari în diferite organe (rinichi, ficat, pancreas, mucoasa stomacului).

O sursă foarte importantă de enzime utilizată frecvent pentru fabricarea preparatelor enzimatice o formează microorganismele. Ele au mai multe avantaje faţă de sursele de enzime atât de origine vegetală cât şi animală. Microorganismele se pot obţine cu uşurinţă, în cantităţi mari, prin înmulţire în instalaţii speciale, pe medii de cultură ieftine. În acest fel, obţinerea unor cantităţi mari de preparate enzimatice nu este limitată de lipsa sau de costurile materiei prime, ca în cazul enzimelor de origine animală. Ciclul de dezvoltare al microorganismelor este foarte scurt în raport cu ciclul de dezvoltare al animalelor şi plantelor, iar mediile de cultură pe care se cultivă microorganismele sunt, de regulă, subproduse agricole sau/şi ale industriei alimentare.

Prima exploatare modernă a enzimelor de fermentaţie o datorăm lui Takamine, care, în 1894, a extras cu succes un amestec enzimatic din orez fermentat numit "koji" bogat în α-amilază şi care s-a vândut în Japonia ca un adaos digestiv de uz uman. Mai târziu, s-a iniţiat în Statele Unite producţia de "takadiastază".

La începutul secolului al XII-lea, Otto Rohm, în Germania, a descoperit că efectul de curăţare a pieilor cu ajutorul excrementelor de câine şi de porc se datorează enzimelor proteolitice pe care acestea le conţin. El a demonstrat ulterior că enzimele extrase din pancreasul animal sunt mai bune decât excrementele şi a arătat că acestea se pot obţine şi prin cultivarea fungilor în culturi de suprafaţă. Enzimele extrase din organismele superioare şi-au găsit foarte devreme numeroase aplicaţii. De exemplu, studiile asupra fenomenului de terciuire la fabricarea berii a relevat importanţa enzimelor din malţ asupra mobilităţii glucidelor şi proteinelor de rezervă. Aceasta a condus la utilizarea extractului de malţ îmbogăţit în enzime şi în alte domenii. Efectul de frăgezire a cărnii cu ajutorul plantei tropicale *Carica papaya* se datorează înaltei activităţi proteolitice a sucului acesteia, astfel încât acum această plantă se cultivă special în acest scop. Alte enzime se extrag din diferite organe ale animalelor. Un exemplu de acest fel îl constituie tripsina şi chimotripsina, care se extrag din pancreas de porc. Alcooldehidrogenaza se extrage din ficatul de cal, iar catalaza din ficatul de bovine. Sursele de enzime aşa cum sunt cele din organele de la animalele domestice par. a fi mai economice faţă de procedeul cultivării de microorganisme şi în momentul de faţă o parte din cererea pieţei pentru enzime este satisfăcută de aceste preparate enzimatice extrase din

plante și organisme animale superioare. Ele prezintă, însă, uneori câteva dezavantaje. Țesuturile animale necesare extracției enzimelor sunt limitate. Prin urmare, în cazul unei cereri temporare mari de enzime este dificil să se coreleze cererea cu oferta. De aceea este nevoie de metode intensive de cultivare și colectare a materiei prime necesare obținerii enzimelor. Adesea este o competiție pentru materialele din care se extrag produse biologice valoroase. Din cauză că aprovizionarea cu materii prime provenite din agricultură este în mod obișnuit sezonieră și uneori necontrolabilă, datorită condițiilor climatice adesea nefavorabile, enzimele extrase din aceste surse sunt considerate mai mult un subprodus al materiilor prime agricole decât un produs primar.

Din acest punct de vedere, altfel stau lucrurile cu microorganismele utilizate ca sursă de enzime.

Până în anul 1945, obținerea enzimelor prin fermentație la nivel industrial s-a putut dezvolta și extinde încet datorită faptului că sistemul de cultivare de suprafață a microorganismelor avea posibilități limitate. Începând însă cu anul 1940, a fost pusă la punct *tehnica fermentației în sistem submers*, în vase agitate și aerate, care s-a dezvoltat mai întâi pentru antibiotice și s-a dovedit o metodă excelentă de cultivare a microorganismelor. Foarte repede aceasta a fost aplicată pentru fabricarea enzimelor utilizând bacterii. Fabricarea enzimelor în sistem submers, după anul 1940, s-a extins foarte mult, iar vânzările au crescut în timp, în mod considerabil, astfel încât la ora actuală se produc 2–3 t enzime proteolitice anual. Cronologia introducerii în fabricație a enzimelor de fermentație poate fi urmărită în tabelul 10.1.

Recent au apărut numeroase studii referitoare la biosinteza enzimelor, cu specificarea microorganismelor producătoare, Aunstrup (1980). Lambert (1983) descrie detaliat tehnica de obținere a enzimelor din fungi, acordând spații largi proceselor de *fermentație pe mediu solid*.

Tabelul 10.1

Date aproximative privind începuturile producerii diferitelor enzime prin fermentație (după G.M.Frost, 1984)

Perioada	Enzima produsă	Tipul de fermentație	Specia producătoare
1	2	3	4
Înainte de 1920	α-Amilază	Substrat solid	*Aspergillus oryzae*
1920–1930	Pectinază	Substrat solid	*Aspergillus niger*
	α-Amilază	Lichid de cultură neagitat	*Bacillus subtilis*

Tabelul 10.1 (continuare)

1	2	3	4
1930–1940	Proteinaze	Substrat solid	*Aspergillus niger*
1940–1950	Amiloglucozidază	Substrat solid	*Aspergillus niger*
1950–1960	α-Amilază	Submers	*Bacillus subtilis*
	Glucozoxidază/catalază	Submers	*Aspergillus niger*
	Amiloglucozidază	submers	*Aspergillus niger*
1960-1970	Proteinaze (pentru coagularea laptelui)	Substrat solid	*Mucor spp.*
	Proteinaze	Submers	*Bacillus spp.*
	β-Galactozidază (lactază)	Substrat solid	*Kluyveromyces spp.*
	β-Galactozidază (lactază)	Substrat solid	*Aspergillus spp.*
1970-	α-Amilază termorezistentă	Submers	*Bacillus licheniformis*
	Glucozizomerază	Submers	Diferite surse microbiene
	Pullulanază	Submers	*Klebsiella aerogenes*

10.2. AVANTAJELE PRODUCERII ENZIMELOR PRIN FERMENTAȚIE

Este recunoscut faptul că celulele microbiene au un potențial deosebit ca sursă de enzime, oferind o serie de avantaje:

– cultivarea de celule microbiene poate fi mărită relativ uşor, dacă cererea pieței este mare, prin ridicarea la scară pilot sau industrială a procedeului;

– celulele microbiene au o varietate mai mare de enzime care pot fi extrase şi cu un spectru de utilizare mult mai larg;

– în contrast cu organismele superioare, celulele microbiene pot fi cultivate repede şi uşor în condiții controlate pe medii de cultură accesibile şi relativ ieftine. Ele pot fi modificate genetic cu uşurință, sporind considerabil eficiența lor de sinteză. Datorită unui interval de generație scurt (mai puțin de 30 de minute în unele cazuri), ele pot fi rapid îmbunătățite prin tehnici speciale, moderne;

– ciclul unei fermentații discontinue este de 1–10 zile, în timp ce ciclul de viață tipic pentru un organism superior este cuprins între 1 lună şi câțiva ani,

ceea ce nu permite investigații și îmbunătățiri de productivitate într-un timp rezonabil. Fermentația permite utilizarea unei tulpini selecționate care să asigure o productivitate înaltă și permanentă.

Flexibilitatea proceselor de fermentație poate fi ilustrată de producția de enzime de coagulare a laptelui utilizate în industria de brânzeturi. Inițial, în acest scop s-a utilizat stomac integral de vițel. Mai târziu s-a dezvoltat procedeul utilizării extractelor enzimatice din stomac de vițel, acestea conținând proteinaze și renină. Deoarece, după anul 1950, numărul de viței sacrificați a scăzut în raport cu producția de brânzeturi care a crescut, a fost necesar să se găsească o altă modalitate de obținere a enzimelor coagulante ale laptelui. Așa s-a ajuns la ideea folosirii microorganismelor pentru obținerea preparatelor enzimatice. În 1968, Sardinas a descris un program în care s-au testat 921 de tulpini bacteriene și o specie de ciuperci: (*Endothia parasitica*) producătoare de enzime potrivite pentru coagularea laptelui. Cel mai mare succes l-a înregistrat enzima podusă din *Mucor miehei*, care se vinde la concurență cu renina de vițel sau cu amestecul conținând pepsină de porc și de vițel care sunt coagulanții efectivi ai laptelui.

O instalație industrială de producere a enzimelor prin biosinteză microbiană poate fi proiectată la o scară foarte apropiată de cerința pieței. Dacă mai târziu necesarul de enzime scade din diverse motive, instalația respectivă poate fi adaptată pentru alte produse de fermentație. Acest lucru s-a întâmplat în producția mondială de proteinaze utilizate în industria de detergenți. La începutul anului 1970, dintr-o dată a scăzut cererea de proteaze pentru detergenți, a apărut un exces de capacitate de producție, dar acesta s-a utilizat la producerea amiloglucozidazei solicitată în cantități mari de industria amidonului, în plină dezvoltare la acea vreme.

După ce enzimele extrase din organismele superioare au fost utilizate și s-a dovedit avantajul lor, se pot aplica două tehnici care oferă posibilitatea transferării producției lor într-un bioproces. Astfel, în perioada 1980–1990, s-au stabilit la nivel de laborator tehnologii de culturi de celule animale sau vegetale care ulterior au fost folosite la extracția enzimelor. În prezent pentru culturi de celule vegetale s-au pus la punct procedee de obținere la nivel industial, dar, în cazul celulelor animale, acestea sunt mult mai fragile și nu supraviețuiesc în asemenea instalații. O alternativă posibilă și mult studiată în prezent în domeniul producerii enzimelor o constituie transferul genelor de interes în celule de microorganisme împreună cu promotori potriviți, care să permită un nivel înalt de expresie. Această tehnică s-a aplicat la renina de vițel, la care precursori ai enzimei s-au exprimat prin gene clonate în tulpini de *Escherichia coli* și *Sacharomyces cerevisiae*. Precursorii au fost purificați, activați și s-a demonstrat că ei posedă aceleași proprietăți ca enzima purificată din stomac de vițel.

10.3. ENZIME MICROBIENE CU APLICAȚII INDUSTRIALE. DOMENII DE UTILIZARE

Principalele aplicații ale enzimelor de fermentație utilizate pe scară largă în perioada de după 1983 sunt prezentate în tabelul 10.2 (Frost, 1984, și Moss, 1985).

Tabelul 10.2

Enzime microbiene cu aplicații industriale

Denumirea enzimei	Industriile utilizatoare	Tipul de fermentație	Felul enzimei	Forma de condiționare
1	2	3	4	5
1.Enzime proteolitice				
Enzime proteolitice bacteriene alcaline	Detergenți Procese alimentare Pielărie	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
Enzime proteolitice bacteriene neutre	Industria berii Industria alimentară	Submers	Extracelulare (Ex)	
Enzime proteolitice fungice	Panificație Industria brânzeturilor	Submers Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex)	Solid (S) Lichid (L) Solid (S)
2. Enzime amilolitice				
α – Amilaze bacteriene	Amidon, bere Detergenți, textile	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
α – Amilaze fungice	Amidon, Panificație	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
Amiloglucozidaze	Amidon, bere	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
Pullulanaze	Amidon	Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex) Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
3. Alte glicozidaze				
Lactază (β-galactozidază)	Industria laptelui	Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex) Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
Invertază	Industria textilă	Submers	Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
Rafinază (α - galactozidază)	Rafinarea zahărului	Submers	Intracelulare (In)	Imobilizată (Im)
Celulaze	Industria alimentară (sucuri)	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
β - 1,3(4)– Glucanaze	Fabricarea berii	Submers	Extracelulare (Ex)	Lichid (L)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 10.2 (continuare)

1	2	3	4	5
4. Alte hidrolaze				
Lipaze	Industria alimentară Teste de diagnostic	Submers	Extracelulare (Ex)	Solid (S)
Pectinaze	Industria de sucuri și băuturi alcoolice	Submers în culturi de suprafață	Extracelulare (Ex)	Lichid (L) Solid (S)
5. Alte enzime				
Glucozizomerază	Amidon	Submers	Intracelulare (In)	Im
Glucozoxidază	Industria alimentară (sucuri, băuturi tari) Teste de diagnostic	Submers	Intracelulare (In)	Solid (S) Lichid (L)
Catalază	Industria alimentară (sucuri)	Submers	Intracelulare (In)	Lichid (L) Solid (S)
Penicilinacilază	Antibiotice	Submers	Intracelulare (In)	Im

O analiză a pieței de enzime a fost efectuată și de Godfrey și Reichelt, 1983. Enzimele de fermentație reprezintă aproximativ 80% din totalul de enzime produse astăzi în lume. Dintre celelalte enzime, obținute prin extracție, necesitățile sunt acoperite de următoarele preparate: cheag de vițel, β-amilaza din orz, proteinaza pancreatică și mici cantități de enzime cu uz farmaceutic sau analitic.

Dintre enzimele de fermentație, cea mai mare piață de desfacere o au proteinazele bacteriene alkaline utilizate în detergenți. Proteinazele microbiene acoperă 40% din totalul pieței, iar glicozidazele aproximativ 20%, astfel că enzimele hidrolitice domină piața. Cantitatea de enzime estimată a fi vândută anual este de 65 000 t. Conținutul în proteină al enzimelor comercializate variază între 1% în produsele nepurificate, sub formă lichidă, și 100% în produsele precipitate și uscate. Valoarea totală a vânzărilor se situează anual la nivelul de 600 milioane de dolari.

10.2. ENZIME INTRACELULARE DE FERMENTAȚIE

În categoria enzimelor intracelulare sunt incluse toate enzimele care rămân cu biomasa, după separarea lichidului de fermentație. Unele enzime se acumulează probabil în periplasmă, astfel încât în mediul de cultură se află cantități mici de enzime rezultate din ruperea pereților unui număr mic de celule.

În tabelul 10.3 sunt enumerate cele mai importante enzime microbiene intracelulare cu aplicaţii industriale. Majoritatea acestor enzime acţionează asupra unor substraturi cu masă moleculară mică. Aceasta se explică prin faptul că numai substraturile mici pot pătrunde în celule şi funcţionează astfel ca inductori ai enzimelor care le degradează. Spre deosebire de acestea, enzimele extracelulare acţionează, în general, asupra substraturilor cu masă moleculară mare.

Enzimele intracelulare se împart în două categorii: unele au o poziţie centrală în metabolismul organismului în creştere şi se produc în cantităţi mari în biomasă, altele au un rol secundar, obscur şi se produc în cantităţi mici. Pentru utilizarea acestora din urmă în scopuri industriale, este necesară imobilizarea lor, astfel încât să fie economică şi justificată folosirea lor.

Tabelul 10.3

Enzime intracelulare, de fermentaţie, cu aplicaţii industriale

Enzima	Microorganismul producător	Durata fermentaţiei, h	Nivelul de producţie	După
Penicillin-acilază	*Escherichia coli* *Escherichia coli*	48 10	Laborator 100 l	Dogariu şi colab, 1975 Self, 1969
α - Galactozidază	*Mortierella vinacea* *Saccharomyces cerevisiae*	72 48	Laborator Laborator	Suzuki, 1969 Olivieri, 1984
Glucozizomerază	*Streptomyces albus* *Streptomyces sp.*	53 72	Laborator Laborator	Agenţia industrială de Ştiinţă şi Tehnologie, 1974 Stoichev, 1981
Glucozoxidază	*Aspergillus niger*	20	500 l	Zetelaki, 1970
Pullulanază	*Klebsiella aerogenes*	23	15 l	Bulich, 1978
Lactază	*Candida pseudotropicalis*	24	Laborator	De Bales şi Castillo, 1979

În ceea ce priveşte activitatea enzimatică a preparatelor de acest fel, aceasta reprezintă, de cele mai multe ori, un secret de serviciu, deoarece poate face oricând obiectul unui brevet de invenţie. Pentru ca o enzimă să fie economică, ea trebuie să aibă o activitate enzimatică minimă (de aproximativ 100 UE/ml). De aceea, unele enzime cum sunt, de exemplu, penicilinacilaza, glucozizomeraza, α-galactozidaza la care nu se atinge această valoare se imobilizează. Alteori, aceste

enzime se utilizează pentru atacul unor impurităţi care incomodează procesul, dar nu se doreşte atacul componentei majoritare; de exemplu, pullulanaza este folosită la hidroliza legăturilor α-1,6 aflate în număr mic în amidon pentru a facilita acţiunea amiloglucozidazei sau β-amilazei. Glucozoxidaza este folosită, de exemplu, pentru îndepărtarea urmelor de glucoză din praful de ouă folosit la obţinerea maionezei şi în acest caz nu trebuie să aibă o activitate enzimatică mare. În alte cazuri, glucozoxidaza, care este o enzimă implicată în mecanismul de reglare a *p*H-ului, se acumulează în cantităţi mari în miceliul de *Aspergillus niger*. Lactaza se produce în medii de fermentaţie pe bază de lactoză şi în acest caz se produc cantităţi mari din această enzimă.

Producerea enzimelor intracelulare prin fermentaţie ridică unele probleme specifice. Bioprocesul trebuie astfel condus încât pe parcursul biosintezei să se evite spargerea celulelor. Dacă se alege un mediu de fermentaţie în care activitatea enzimatică este distribuită atât în celule cât şi în lichidul de fermentaţie, izolarea şi purificarea enzimei este dificilă.

Un alt aspect se referă la stabilitatea enzimelor; unele enzime sunt stabile în mediul intracelular şi devin instabile în afara celulei.

Unul dintre dezavantajele procedeelor de obţinere prin biosinteză a enzimelor intracelulare îl constituie necesitatea eliberării acestora din celule, prin distrugerea membranei celulare, extracţie şi ulterior separarea extractului de resturile celulare. În plus, enzimele sunt impurificate cu toate proteinele intracelulare, chiar dacă enzima dorită se află în proporţie mare în totalul proteinelor extrase din celule. Un avantaj tehnologic al enzimelor intracelulare îl constituie faptul că extracţia se poate efectua cu un volum mic de soluţie tampon, ceea ce conduce la obţinerea unui extract brut cu conţinut mare în enzimă şi nu mai este necesară concentrarea ulterioară a acesteia. În ansamblu, însă, recuperarea enzimelor extracelulare este un proces mai avantajos şi mai ieftin decât a celor intracelulare.

10.5. ENZIME DE FERMENTATIE, EXTRACELULARE

Aunstrup (1980) a făcut o recenzie completă a enzimelor de fermentaţie extracelulare, cu aplicaţii industriale.

Cele mai importante enzime microbiene extracelulare sunt, în general, hidrolazele (proteinaze, amilaze, celulaze) care acţionează asupra substraturilor cu masă moleculară mare. Pentru microorganisme, este normal, din punct de vedere fiziologic, să producă nutrienţi din polimerii biologici disponibili în mediul

înconjurător celulelor. Pentru a ataca mai uşor substraturile, microorganismele îşi produc singure enzimele necesare hidrolizei acestora şi uneori această producţie de enzime este optimă chiar la tulpinile sălbatice.

Enzimele hidrolitice produse prin fermentaţie şi utilizate în cantităţi mari în industrie sunt proteazele, amilazele şi celulazele. Acestea sunt comercializate şi utilizate în industria: detergenţilor, alimentară şi textilă.

Majoritatea enzimelor extracelulare comerciale sunt utilizate la temperaturi de până la 100°C, chiar dacă acestea, în general, sunt instabile în timp. Ele au, de asemenea, o toleranţă limitată la *p*H. La temperatura camerei sunt, în general, instabile dacă nu sunt condiţionate în mod specific. Păstrarea la 4°C conferă enzimelor o stabilitate în timp mult mai mare.

Pentru că producţia unei enzime extracelulare utilizează în cea mai mare parte resursele disponibile ale celulei, biosinteza şi secreţia unei astfel de enzime sunt supuse unui complex de factori reglatori. În general, producţia acestor enzime este indusă de niveluri reduse ale produşilor de reacţie ai polimerilor, iar uneori polimerii înşişi funcţionează ca inductori. Alteori, compuşii care nu sunt substraturi pentru enzime, dar sunt înrudiţi ca structură cu acestea, pot funcţiona ca inductori. De exemplu, producţia de celulaze este indusă atât de lactoză cât şi de celobioză. Producţia acestor enzime este, de asemenea, supusă represiei prin cataboliţi. Atâta timp cât nutrienţii cu masă moleculară mică sunt disponibili, celulele cresc fără să producă hidrolaze şi abia la epuizarea nutrienţilor începe biosinteza enzimelor hidrolitice extracelulare. Astfel, inducţia şi represia biosintezei enzimelor sunt fenomene complexe ce au loc în concordanţă cu condiţiile de mediu în care se găsesc celulele.

Enzimele extracelulare reprezintă 80% din producţia de enzime de fermentaţie comercializate la ora actuală. Cele cu utilizări în industrie se produc în bioreactoare de 10–250 m^3, în instalaţii speciale, fiind considerate produse de mare tonaj. Aceste enzime prezintă avantajul unei prelucrări mai rapide, nefiind necesară extracţia din celule (operaţie ce ridică probleme la nivel industrial).

10.6. ENZIME MICROBIENE DE UZ BIOCHIMIC

Spre deosebire de enzimele descrise anterior, există un set de enzime microbiene care se produc în cantităţi mici şi se aduc într-o formă cu grad avansat de purificare. Acestea se folosesc, în general, în determinări analitice sau în medicină. Un exemplu în acest sens îl constituie glucozoxidaza şi lipaza utilizate în testele enzimatice de dozare a glucozei în sânge şi, respectiv, la hidroliza trigliceridelor din sânge.

Enzimele pentru testele de diagnostic se produc în bioreactoare de până la 10 m^3; cererea lor pe piață este mult mai mică, iar uneori necesarul este acoperit prin extracția acestora din celule vegetale sau animale. În anul 1985, numai 50 % din totalul enzimelor de diagnostic erau produse prin procedee fermentative. Pentru că necesarul de astfel de enzime este mic și puritatea cerută este foarte mare, prețul acestor enzime per unitate enzimatică este mult mai mare decât al enzimelor industriale care sunt foarte ieftine (fiind considerate produse de mare tonaj). Pentru enzimele de mic tonaj s-au pus la punct procedee de producție și purificare cuprinzând volume de 50–2000 l mediu de cultură (pentru enzimele extracelulare) sau 1–50 kg biomasă (pentru enzimele intracelulare). Procedeele la acest nivel sunt considerate "scară industrială" (Scawen ș.a.,1980). Unele enzime sunt produse și purificate numai în scop de cercetare. În acest caz, metodele de purificare sunt mai bine puse la punct decât procesele de obținere propriu-zisă a enzimelor.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11 METODE DE BIOSINTEZĂ A ENZIMELOR

11.1. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ENZIME

Prima problemă care se pune la obţinerea de preparate enzimatice cu ajutorul microorganismelor este găsirea unui microorganism care să producă în cantitate mare enzima sau sistemul enzimatic dorit. Pentru fabricarea preparatelor enzimatice, un interes practic deosebit îl prezintă microorganismele heterotrofe.

Pentru ca un microorganism să poată ataca un substrat natural şi să-l metabolizeze, el trebuie să posede enzimele necesare care să catalizeze reacţiile de metabolism, în condiţiile de mediu proprii pentru dezvoltare. Totalitatea enzimelor pe care un microorganism le posedă în permanenţă sau pe care poate să le elaboreze la nevoie formează echipamentul enzimatic potenţial al microorganismului. Însuşi echipamentul enzimatic este, la rândul lui, determinat de genetica microorganismului. Zestrea ereditară constituită din gene care sintetizează enzimele microorganismelor variază însă de la o specie la alta.

Majoritatea enzimelor care alcătuiesc echipamentele enzimatice ale microorganismelor sunt enzime intracelulare. Aceasta înseamnă că enzimele sintetizate de gene, după formare, rămân în celulă, nefiind secretate în mediul înconjurător, în care microorganismele se dezvoltă. Activitatea lor se desfăşoară în interiorul celulei. Unele microorganisme, cum sunt drojdiile, bacteriile lactice, nu conţin decât enzime intracelulare. La astfel de microorganisme eliberarea enzimelor în mediul înconjurător are loc abia după moartea celulelor, în urma proceselor de autoliză. Din această cauză, astfel de microorganisme nu metabolizează decât substraturi nutritive solubile şi permeabile prin membranele lor celulare.

Alte microorganisme, aşa cum sunt bacteriile din genul *Bacillus* sau fungii din genul *Aspergillus*, elaborează pe lângă un mare număr de enzime intracelulare şi enzime extracelulare, pe care le secretă în mediul înconjurător. Enzimele

BOKU - VIENNA UNIVERSITY LIBRARY

extracelulare sunt, în general, hidrolaze şi sunt secretate de microorganisme cu scopul de a degrada substraturile isolubile şi solubile cu molecule mari la compuşi solubili uşor asimilabili.

Este de reţinut faptul că factorii care determină înmulţirea şi dezvoltarea celulei vor determina şi declanşarea biosintezei enzimelor. Un rol important în formarea enzimei îl are existenţa în mediul de cultură a substratului care induce formarea enzimei specifice degradării respectivului substrat. El constituie inductorul operonului enzimei.

Primul studiu sistematic efectuat în această direcţie a fost efectuat de Karström (1955), care împarte enzimele în două grupe: enzime constitutive şi enzime adaptative.

Enzimele constitutive se sintetizează în celule în mod permanent. Concentraţia lor este însă influenţată de prezenţa sau absenţa în mediul de cultură a substraturilor pe care ele le metabolizează. Concentraţia acestor enzime poate să varieze şi sub influenţa altor factori: sursa de azot, sursa de carbon, factorii de creştere, sărurile minerale, temperatura, *p*H-ul etc.

În schimb, sinteza **enzimelor adaptative** este declanşată numai de prezenţa substraturilor specifice în mediul de cultură sau atunci când este nevoie de prezenţa lor în procesele metabolice.

Pe baza unor studii îndelungate şi de profunzime cu privire la biosinteza enzimelor induse de substrat s-a ajuns la următoarele concluzii:

– elaborarea de către un microorganism a unei enzime induse are loc numai în prezenţa inductorului; ca inductor funcţionează, de obicei, substratul care trebuie metabolizat; funcţia de inductor pot să o îndeplinească şi substanţele înrudite structural cu acesta, dar care nu pot îndeplini funcţia de substrat;

– biosinteza are loc pornind întotdeauna de la substanţe cu structură simplă;

– procesul de biosinteză decurge cu consum de energie şi din acest motiv, pe lângă substanţele necesare sintezei (aminoacizi, vitamine, diferiţi cationi), este nevoie în mediu şi de o sursă de carbon, de obicei un glucid;

– sinteza enzimelor induse are loc, de regulă, în timpul înmulţirii microorganismului; ea poate să aibă loc în starea staţionară, dacă sunt prezente inductorul şi substraturile de sinteză;

– procesul de biosinteză al enzimelor este inhibat de toate substanţele care inhibă biosinteza substanţelor proteice, de exemplu cloramfenicolul;

– biosinteza enzimelor induse este inhibată ori de câte ori în mediul de cultură este prezent un substrat uşor metabolizabil de către enzimele constitutive ale microorganismului;

– biosinteza unei enzime induse este inhibată selectiv şi de metaboliţii rezultaţi din reacţiile de transformare ale inductorului, datorită activităţii acestuia; fenomenul se numeşte *represie*.

Prin urmare, se poate spune că procesul de biosinteză a unei enzime induse este rezultatul acţiunii antagoniste a inductorului şi a metaboliţilor.

11.2. SELECŢIA TULPINILOR ŞI AMELIORAREA LOR

11.2.1. Alegerea tulpinii producătoare de enzime

Prima decizie importantă care trebuie luată într-un proces de producere a unei enzime cu ajutorul microorganismelor este alegerea unui organism producător corespuzător. Când se alege microorganismul potenţial producător de enzime, trebuie să se aibă în vedere următoarele:

– dacă enzima de interes este produsă intra- sau extacelular; avantajele şi dezavantjele care derivă din localizarea enzimelor au fost discutate în subcapitolele 1.4 şi 1.5. Când se aleg tulpinile de producţie, este de dorit să se testeze dacă enzimele de interes, după biosinteză, se găsesc numai în celule sau numai în mediul de cultură extracelular. Preferinţa pentru localizarea enzimei va fi dictată de stabilitatea enzimei, complexitatea mediului de producţie şi uşurinţa dezintegrării celulelor în vederea purificării enzimei de interes;

– există două zone de interes pentru păstrarea siguranţei mediului înconjurător şi a produsului enzimatic însuşi. Prima ar fi potenţiala ameninţare a tulpinii producătoare de către produşii de sinteză ai microorganismului folosit. A doua este potenţiala contaminare a preparatului enzimatic cu o tulpină patogenă sau cu toxine provenite de la microorganismul producător de enzime. Această din urmă restricţie are relevanţă mai mare asupra enzimelor utilizate în alimentaţie. Microorganismele folosite prin tradiţie în alimentaţia umană sunt deseori preferate pentru producerea de enzimă, datorită faptului că necesită mai puţine teste toxicologice comparativ cu alte surse microbiene. Nu este deloc întâmplător că multe enzime produse comercial sunt obţinute cu tulpini din genurile *Bacillus* şi *Aspergillus*, care, în general, sunt microorganisme nedăunătoare;

– microorganismul ales trebuie să fie capabil să crească în medii de cultură simple, ieftine şi care să nu necesite adăugarea de promotori de creştere scumpi, să fie stabil din punct de vedere genetic, să producă cantităţi mari din enzima dorită în cel mai scurt timp posibil, să fie uşor de separat din mediul de

biosinteză la sfârşitul fermentaţiei şi, dacă este cazul (pentru enzime intracelulare), să fie uşor dezintegrabil.

Multe microorganisme utilizate pentru producerea de enzime pot fi izolate din natură. De exemplu, microorganismele care hidrolizează lactoza pot fi găsite deseori asociate cu produse lactate, iar microorganismele celulozolitice pot fi izolate din produse lemnoase putrezite natural. Realizând o cultură îmbogăţită, aplicând procesul de selecţie unei specii luate din mediul natural, este posibil să se obţină culturi pure de microorganism producător de enzima dorită, dar foarte probabil în cantităţi mici.

O altă sursă de microorganisme producătoare de enzime sunt colecţiile de microorganisme realizate în multe laboratoare din lume (Lapage şi colab., 1970; Martin şi Skerman, 1972; Hesseltine şi Haynes, 1973), ATCC, WFCC, I..F.O. în ale căror cataloage sunt trecute tulpinile şi caracteristicile lor.

11.2.2. Ameliorarea tulpinilor de microorganisme

Este unanim recunoscut că, în general, microorganismele izolate din natură produc enzima dorită la niveluri prea scăzute pentru a fi folosite economic într-un proces de producţie. Din această cauză, ameliorarea genetică a microorganismului devine esenţială în punerea la punct a procesului de biosinteză a enzimei. Programul de ameliorare cuprinde, de regulă, câteva obiective:

- creşterea producţiei în enzima dorită;
- reducerea sau eliminarea enzimelor contaminante care pot cauza reacţii nedorite în anumite aplicaţii;
- modificarea metabolismului microorganismului producător astfel încât produsul dorit să fie biosintetizat în cantităţi mai mari decât sub influenţa unui posibil inductor scump, adăugat în mediu;
- organismul producător trebuie să producă enzima în condiţii normale de represie prin cataboliţi şi inhibiţie prin produs finit.

Pentru ameliorarea tulpinilor există trei metode principale folosite în mod curent:

- ***ameliorarea prin mutaţie şi selecţie***, utilizată, cu succes, în multe aplicaţii în microbiologia industrială de mulţi ani şi care a făcut subiectul multor lucrări de specialitate (Calam, 1964, 2970; Elander şi colab., 1977, Rowlands, 1983, 1984);
- ***hibridizarea***, care implică modificarea informaţiei genetice dintr-o celulă prin transferul de ADN de la altă tulpină;
- ***tehnologia ADN recombinant***, prin care informaţiile genetice aparţinând unei tulpini pot fi manipulate *in vitro* şi apoi inserate în aceeaşi sau în altă tulpină.

Mutaţia şi selecţia clasică. Procedura de bază în această metodă este de a supune o populaţie de microorganisme din tulpina care interesează unui tratament mutagen, cu scopul obţinerii unei populaţii de organisme viabile care sunt genetic modificate la întâmplare faţă de populaţia parentală. Mutageneza tipică este realizată prin expunerea tulpinii parentale radiaţiilor electromagnetice (UV, raze X, radiaţii γ) sau unor mutageni chimici ca: etilmetansulfonatul, etiletansulfonatul, metilmetansulfonatul, nitrozometilguanidina, nitrozoetilureea sau acidul azotos. Empiric, un nivel de tratament se stabileşte la o proporţie mare de letalitate şi la un procentaj mare de indivizi modificaţi genetic în populaţia supravieţuitoare. Supravieţuitorii sunt apoi izolaţi şi separaţi pentru ameliorarea caracterului dorit. În acest stadiu se cere în mod special intuiţie şi ingeniozitate pentru a alege eficient câteva mutante folositoare din mii de celule cu caractere nedorite. Cel mai bun mod de a rezolva aceasta constă în separarea celulelor pe un mediu solid corespunzător, ceea ce permite identificarea unui număr mare de supravieţuitori mutagenizaţi.

Explicaţia efectului mutagen atât al factorilor fizici cât şi al celor chimici este bine cunoscută; radiaţiile UV cu λ=254 nm sunt puternic absorbite de ADN şi, ca urmare, multe microorganisme mor, iar la cele ce supravieţuiesc apar frecvente mutaţii induse. Efectul mutagen se datorează celor două tipuri de modificări chimice:

– hidratarea citozinei la nivelul dublei legături dintre atomii de carbon care poate persista suficient pentru a slăbi legătura de hidrogen cu purina complementară, determinând o separare localizată a catenei lezate şi apariţia unor mutaţii de tranziţie;

– formarea de legături covalente între resturile de pirimidină adiancente pe aceeaşi catenă (dimeri de pirimidină), care distorsionează macromolecula de ADN, interferând cu împerecherea normală a bazelor.

Agenţii chimici mutageni pot fi clasificaţi după modul lor de acţiune în trei categorii:

– analogi ai bazelor, care sunt încorporaţi în ADN şi produc erori de replicare (5-bromuracil);

– agenţi care modifică bazele nucleotidice în aşa fel încât produc erori de împerechere sau le fac susceptibile pentru modificări chimice spontane (acidul azotos, agenţii alchilanţi);

– agenţi care interacţionează cu ADN-ul şi cu structura sa secundară, producând distorsiuni locale ale moleculei, favorizând erori de replicare şi de recombinare (coloranţii de acridină). Hopwood (1970) a desris câteva metode de izolare a mutanţilor.

Tehnicile de cultivare continuă pot fi folosite pentru a selecţiona tulpini mutante cu activitate enzimatică modificată şi potenţial crescut de producţie (Smith

şi Dean, 1972; Harder şi colab., 1977; Melling, 1977; Sikyta şi colab., 1982, Dykhuizen şi Hartl, 1983).

Factorii de bază care guvernează selecţia mutantelor în cultură continuă privesc relaţiile dintre concentraţia substratului limitativ de creştere a organismelor prezente în chemostat în condiţii constante. Concentraţia substratului limitativ (*S*) este dată de rata de creştere (sau rata de diluţie într-un chemostat "steady-state") prin expresia:

$$S = K_S \frac{D}{\mu_{max} - D},$$

în care *D* este rata de diluţie (=μ, viteza specifică de creştere); μ_{max} – rata specifică maximă de creştere; K_s – o constantă de saturare egală cu concentraţia substratului când $\mu = 0{,}5 \cdot \mu_{max}$.

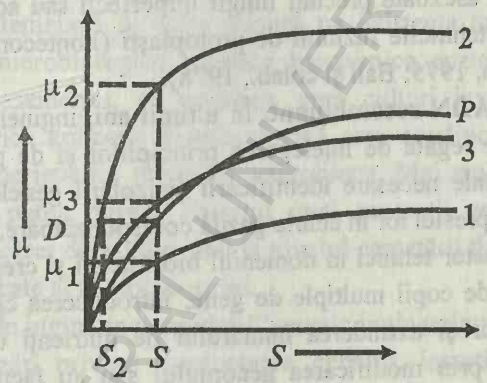


Fig. 11.1. Selecţia tulpinilor mutante în cultură chemostat (după G. M. Frost).

În fig. 11.1 sunt schematizate curbele concentraţiei substratului în funcţie de rata de creştere pentru tulpina parentală (*P*) şi diferite tulpini mutante ipotetice M_1, M_2 şi M_3.

La o rată a diluţiei *D*, concentraţia nutrientului limitativ este *S*. Mutanta *1*, la această concentraţie a substratului, va avea o rată de creştere μ_1, iar când μ_1 este mai mic decât *D*, această mutantă va fi scoasă afară din chemostat şi nu va supravieţui. Mutanta *2* poate creşte cu o rată μ_2, iar când μ_2 este mai mare decât *D* ea se va acumula rezultând o scădere a concentraţiei substrarului la valoarea S_2. La această concentraţie, tulpina parentală va avea o rată de creştere mai mică decât *D* şi va fi scoasă din chemostat. Curba mutantei *3* intersectează curba tulpinii parentale; în acest caz, la rate mici de diluţie, mutanta va supravieţui, în timp ce la diluţii ridicate mutanta va fi scoasă afară. Controlând natura şi concentraţia substratului limitativ şi rata de diluţie, se poate realiza îmbogăţirea populaţiei de microorganisme producătoare cu mutante mai performante.

În domeniul producției de enzime, astfel de tehnici au fost utilizate pentru selecția de tulpini înalt producătoare de β-galactozidază, D-serindeaminază, ribitoldehidrogenază, penicilinamidază (Sikyta şi Kyslik, 1980), proteaze alcaline (Wang, Weimin, 1987, 1993).

Hibridizarea. La organismele care posedă un stadiu sexuat în ciclul lor de viață este posibil să se efectueze modificări genetice prin tehnici de hibridizare ca "conjugarea" – proces prin care ADN-ul dintr-o celulă bacteriană este transferat altei celule prin contact direct (Willetts, 1984)(4) – sau "transformarea", prin care ADN-ul eliberat de către o celulă în mediul său de cultură este încorporat într-o altă celulă intactă (Stanisich, 1984). Pe de altă parte, bacteriofagii pot fi utilizați la transferul de informații genetice prin procesul de "transducție", ADN-ul dintr-o celulă-donor fiind transferat unei celule-receptoare de către o capsidă de bacteriofag (Ozeki şi Ikeda, 1968; Stanisich, 1984).

Organismele asexuate precum fungii imperfecți sau actinomicetele pot fi hibridizate utilizând tehnicile fuziunii de protoplaşti (Pontecorvo şi colab., 1951, Esser, 1974; Johnston, 1975; Ball şi colab., 1978).

Tehnologia ADN-recombinant. În ultimii ani, ingineria genetică a făcut eforturi considerabile legate de înțelegerea principiilor şi de punerea la punct a tehnicilor experimentale necesare identificarii şi izolării genelor, manipulării lor *in vitro*, clonării şi expresiei lor în celule-gazdă corespunzătoare.

Aplicarea acestor tehnici în domeniul biosintezei şi creşterii producției de enzime prin inserția de copii multiple de gene, introducerea caracterului dorit în organismul producător şi extinderea numărului de nutrienți utilizabili de către tulpina producătoare prin modificarea genomului său au făcut progrese remarcabile. De exemplu, inducerea biosintezei unei enzime, în mod normal absente, poate să permită utilizarea unei surse de carbon neutilizabile sau posibilitatea expresiei unei gene specifice unei anumite enzime de la un organism donor la o tulpină receptoare, care poate creşte pe medii simple şi prezintă o mare atracție pentru producătorii de enzime. Cu toate că această tehnologie este în stadiu de dezvoltare, există o listă impresionabilă de gene pentru enzime de interes comercial care au fost clonate şi au fost exprimate în diferite organisme-gazdă (tabelul 11.1).

Perfecționarea procedeelor de fermentație, sporirea gradului lor de eficacitate, descoperirea unui mare număr de bioconversii microbiene merg mână în mână cu utilizarea tehnicilor de recombinare genetică pentru îmbunătățirea tulpinilor şi a tehnologiilor de obținere de substanțe biologic active şi, în special, de preparate enzimatice de interes industrial.

În ceea ce privește procesle biotehnologice cele mai recente, ele se întemeiază atât pe tehnicile clasice cât şi pe tehnicile de recombinare genetică şi/sau folosirea enzimelor, a celulelor sau microorganismelor imobilizate.

După Sansson, expresiile: *recombinări genetice in vitro* sau chiar *recombinarea ADN* sunt de preferat expresiilor *manipulări genetice* sau *inginerie genetică*. După *National Institute of Health* ale S.U.A., moleculele de *ADN recombinat* sunt molecule de ADN sintetizate în afara celulelor vii prin legarea unor segmente de ADN natural sau sintetic cu moleculele care pot să se replice într-o celulă vie. Principiul constă în a reuni un ADN *nativ* şi un ADN *străin* într-un *vector* care este un *plasmid* bacterian sau un genom viral şi a-l introduce apoi într-o *celulă-gazdă*, unde se poate înmulţi. Rezultatul este o clonă de celule *transformate*.

Unul dintre obiectivele *bioindustriei* este de a avea la dispoziţie *celule transformate* în stare să exprime mesajul genetic *străin* pe care ele l-au înregistrat şi, deci, apte să producă molecule proteice specifice în cantitate mare.

Dezvoltarea biotehnologiilor şi utilizarea tehnicilor de inginerie genetică în biotehnologie se întemeiază în mare măsură pe existenţa unor laboratoare bine dotate de cercetări microbiologice, genetice, biochimice, enzimologice, de biologie moleculară şi, de asemenea, pe existenţa unei culturi inventariate şi studiate regulat. În plus, orice aplicaţie biotehnologică este condiţionată de cunoaşterea aprofundată a caracteristicilor tulpinilor microbiene. Mai mult, în măsura în care aceste tulpini vor putea deveni obiectul unei protecţii prin brevete, ele vor reprezenta cheia oricărei dezvoltări, atât la nivelul cercetării fundamentale, cât şi la cel al cercetării aplicate şi al bioindustriei.

Conceptul de inginerie a genelor ("genetic ingineering") este utilizat pentru a desemna preocupări privind manipularea genelor, inserţia genelor, ingineria plasmidelor, tehnologia genelor etc.

Tehnicile prin care se realizează manipulare directă a ADN-ului prin clonare moleculară (tehnologia ADN recombinat), având ca model transferul unor gene din celula animală în celule bacteriene cuprind mai multe etape:

– izolarea genelor naturale sau sinteza chimică a unor molecule de ADN, care codifică proteinele dorite;

– selecţia unui "vehicul" sau vector adecvat, capabil să transforme genele respective şi apt să se replice autonom în celula receptoare;

– asigurarea condiţiilor care permit exprimarea informaţiei genetice străine în celula bacteriană;

– inserţia genelor străine în structura genetică a moleculei vector şi obţinera unei himere moleculare;

– introducerea acesteia într-o celulă bacteriană şi transformarea ei;

– selectarea celulelor modificate genetic din populaţia de celule rezultate prin multiplicare.

11.2.3. Creşterea producţiei de enzime prin ameliorarea tulpinilor

În domeniul producţiei enzimelor de interes comercial, sunt rare publicaţiile referitoare la ameliorarea tulpinilor, acestea constituind secrete de fabricaţie. Faith şi colab. (1971) au prezentat date care arată că numărul factorilor ce influenţează creşterea producţiei de enzime variază între 2 şi 500. De exemplu, producţia de celulaze a fost îmbunătăţită prin tehnicile descrise mai înainte (Cuskey şi colab., 1982; Ghosh şi colab., 1984) şi apoi s-a aplicat în practică. Îmbunătăţirea potenţialului productiv al tulpinii se face în stadiile iniţiale ale cercetării şi apoi se efectuează un calcul economic şi, dacă tehnologia este rentabilă, se aplică industrial.

Tabelul 11.1

Câteva gene care au fost manipulate *in vitro* în cazul unor enzime de real interes comercial

Gena producătoare de	Donor	Gazda	După
1	2	3	4
α-Amilază	*Bacillus sp.* *Bacillus subtilis*	*Bacillus subtilis* *Bacillus subtilis*	Pinches şi colab. (1985) Yamane şi Shinomya (1982)
α-Amilază (termostabilă)	*Bacillus stearothermophilus* *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus licheniformis*	*Bacillus subtilis* *Escherichia coli* *Bacillus subtilis* *Bacillus subtilis* *Escherichia coli*	Mielenz şi Mickel (1982) Polva (1984) Joyet şi colab. (1984)
β-Amilază	*Bacillus stearothermophilus*	*Bacillus sp.*	Outtrup şi colab. (1984)
Celulaze	*Bacillus sp.*	*Escherichia coli*	Sashihara şi colab. (1984)
Celulază (endoglucanază A)	*Chlostridium thermocellum*	*Escherichia coli*	Sacco şi colab. (1984)
β- Glucanază	*Bacillus amyloliquefaciens*	*Escherichia coli*	Borriss şi colab. (1985)
Lactază (termostabilă)	*Bacillus stearothermophilus*	*Bacillus subtilis*	Hirata şi colab. (1985)
Pectinaze	*Erwinia carotovora*	*Escherichia coli*	Zink şi Chatterjee (1985)

Tabelul 11.1 (continuare)

1	2	3	4
Penicilin V Amidază	*Bacillus sphericus*	*Escherichia coli* *Bacillus subtilis*	Olsson şi colab. (1985)
Peptidază	*Pseudomonas sp.*	*Sacharomyces cerevisiae*	Clarke şi colab. (1985)
Proteinază	*Bacillus licheniformis*	*Bacillus subtilis*	Okada şi colab. (1984)
Xilanază	*Bacillus pumilus* *Aeromonas sp.*	*Escherichia coli* *Bacillus subtilis* *Escherichia coli*	Panbangred şi colab. (1985) Kudo şi colab. (1985)
Xilozizomerază	*Escherichia coli*	*Schizosacharomyces pombe*	Ueng şi colab. (1985)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12 ENZIME AMILOLITICE

Multe procese industriale folosesc enzime amilolitice pentru a hidroliza amidonul înaintea utilizării acestuia în procese fermentative sau în alte procese biochimce.

Există mai multe tipuri de enzime capabile să hidrolizeze amidonul. Acestea pot ataca atât amidonul solubil cât şi granulele de amidon aflate în suspensie apoasă. În funcţie de utilizările ulterioare ale hidrolizatului de amidon, se stabilesc condiţiile optime de realizare a hidrolizei enzmatice. Aceasta poate fi parţială sau totală. Gradul de hidroliză care se doreşte să se obţină dictează alegerea unui anumit sistem de enzime amilolitice. Pe de altă parte, înaintea desemnării unui sistem de hidroliză potrivit, este necesară cunoaşterea fenomenelor care influenţează cinetica procesului de hidroliză desfăşurat în prezenţa sistemului de enzime ales. Este cunoscut faptul că produşii finali rezultaţi în urma hidrolizei enzimatice a amidonului inhibă procesul printr-un mecanism atât competitiv cât şi necompetitiv după unii autori, sau produc o inhibiţie exponenţială simplă după alţi autori.

α-Amylase [E.C. 3.2.1.1] sau glicogenaza. Hidrolizează legăturile 1,4-α-D-glicozidice în polizaharide care conţin 3 sau mai multe unităţi de D-glucoză unite prin legături α-1→ 4. Acţionează asupra glicogenului şi oligo- şi polizaharidelor înrudite. Denumirea sistematică este 1,4-α-D-glucan glucanohidrolază.

β-Amylase [E.C. 3.2.1.2] sau glicogenaza. Scindează amidonul, glicogenul, polizaharide şi oligozaharide producând β-maltoză. Denumirea sistematică este 1,4-α-D-glucan maltohidrolază.

Existenţa unor enzime care transformă amidonul în "zahăr" (de fapt într-un amestec de glucide) este cunoscută de mult. Amilaza (sub denumirea veche "diastaza") din bobul de orz a fost obţinută sub forma unui extract apos încă din 1811, de către Kirchoff, iar cea din salivă a fost descoperită de Leuchs, în 1831. Enzimele amilolitice (amilazele) sunt mult răspândite în natură, atât în regnul vegetal cât şi în cel animal. În general, amilazele apar oriunde se găseşte amidon,

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" UNIVERSITY LIBRARY

de exemplu în cartofi, cereale, fasole, soia. Cantităţi mai mari de amilaze, alături de alte enzime apar în boabele de fasole germinate. La animalele superioare amilazele se găsesc în concentraţie mai mare în pancreas, iar la unele specii în salivă.

O sursă importantă de enzime amilolitce descoperită mult mai târziu (1950–1960) o constituie microorganismele. Cea mai stabilă şi utilizată sursă este *Bacillus subtilis*, care a fost primul mcroorganism cultivat în scopul producerii de amilaze, la început în culturi de suprafaţă şi apoi pe medii lichide, în fermentaţii submerse (Underkofler, 1976). În prezent, se cunosc mai multe microorganisme producătoare de enzime amilolitice, aparţinând diferitelor clase sistematice: bacterii, drojdii, fungi.

Astfel, preparatele enzimatice amilolitice de origine microbiologică au invadat piaţa comercială, cele de extracţie producându-se în prezent în cantităţi mult mai mici.

12.1. MODUL DE ACŢIUNE AL ENZIMELOR AMILOLITICE ASUPRA AMIDONULUI

Amidonul, glicogenul, polizaharidele şi oligozaharidele reprezintă substratul natural al enzimelor amilolitice. După cum se cunoaşte, amidonul nu este o substanţă omogenă, ci un amestec de două tipuri de polizaharide: amiloză şi amilopectină. Amiloza este formată din polizaharide ce conţin resturi de glucoză unite între ele prin legături 1,4-α-glicozidice. Gradul de polimerizare variază între 100 şi 2000, iar moleculele au o structură helicală, cu spire formate din 6 molecule de glucoză legate prin punţi de hidrogen. În interiorul spirelor se formează un tub de aproximativ 5Å. În interiorul tubului pot pătrunde molecule de dimensiuni mai mici formând combinaţii de incluziune. O astfel de combinaţie, de culoare albastră, de importanţă practică deosebită, o formează iodul care pătrunde în interiorul tubului. Această reacţie stă la baza recunoaşterii amidonului, fiind utilizată în multe metode de dozare calitativă a acestuia. Când macromoleculele de amilază au un grad înalt de polimerizare, acestea prezintă şi puncte de ramificare, reduse la număr, prin legături 1,3-β-glicozidice (fig. 12.1).

Amilopectina, a doua componentă a amidonului, formează macromolecule ramificate din lanţuri de amiloză scurte (18–26 resturi de glucoză) unite prin legături 1,6-α-glicozidice (fig.12.2), gradul de polimerizare variind între 6000 şi 36 000.

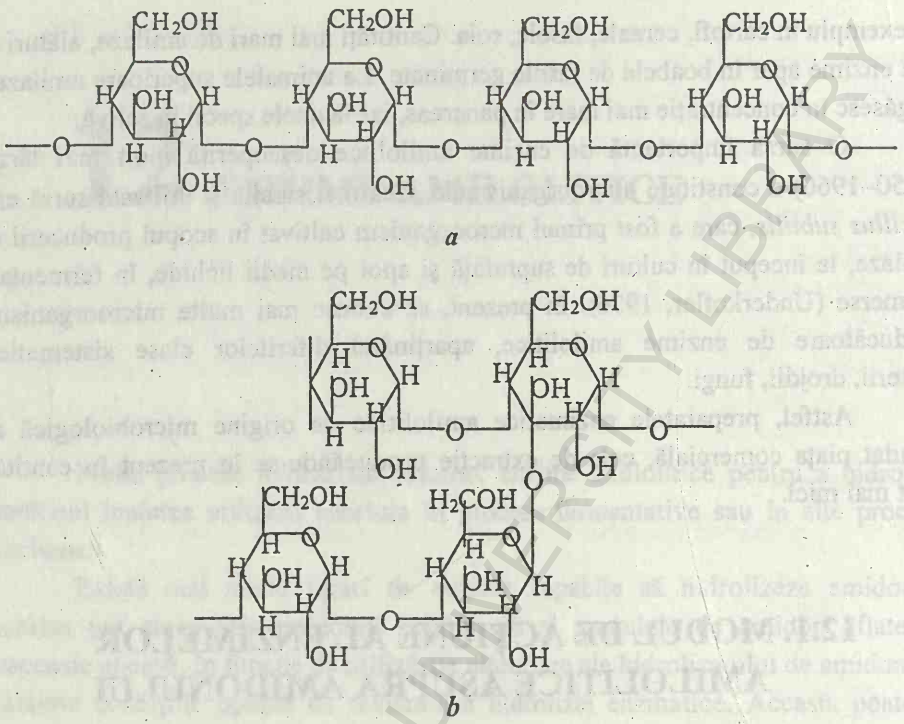


Fig 12.1. Structura amilozei; reprezentarea legăturilor α-1,4-glicozidice şi α-1,3-glicozidice din macromoleculele mari de amiloză (1000–2000 resturi de glucoză):
a – reprezentarea legăturilor α-1,4-glicozidice din amiloză; *b* – reprezentarea legăturilor α-1,3-glicozidice din macromoleculele mari de amiloză.

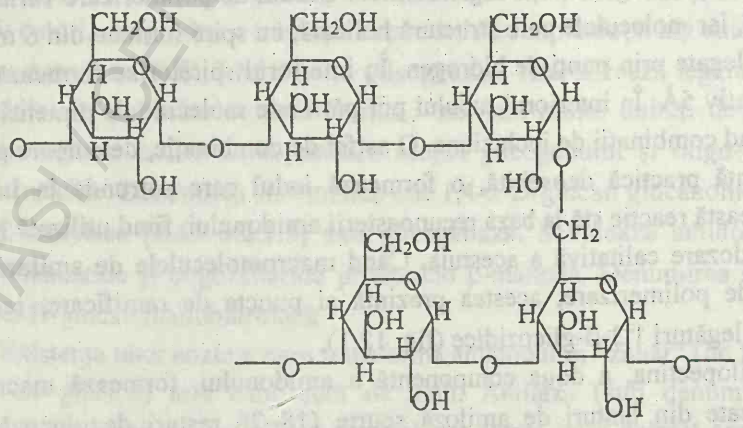


Fig. 12.2. Structura amilopectinei; reprezentarea legăturilor 1,6-α-glicozidice în punctele de ramificare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După cum se poate observa, în structura amidonului există patru tipuri de legături deosebite:

– legături 1,4-α-glicozidice din interiorul macromoleculelor de amiloză şi amilopectină;
– legături 1,4-α-glicozidice marginale;
– legături 1,3-α-glicozidice;
– legături 1,6-α-glicozidice (de ramificare).

În consecinţă, pentru hidroliza completă a amidonului, până la glucoză, este necesară existenţa a patru enzime, după cum se poate urmări în tabelul 12.1.

Tabelul 12.1

Enzime implicate în hidroliza completă a amidonului

Denumirea uzuală a enzimei	Denumirea sistematică	Codul I.U.B.	Tipul de legătură asupra căreia acţionează
α-Amilază	1,4-α-D-Glucan glucanohidrolază	E.C.3.2.1.1.	1,4-α-Glicozidice interioare
β-Amilază	1,4-α-D-Glucan maltohidrolază	E.C.3.2.1.2.	1,4-α-Glicozidice marginale
Amiloglucozidază (glucoamilază)	1,4-α-D-Glucan glucohidrolază	E.C.3.2.1.3.	1,3-α-Glicozidice
Glucozidaze (pullulanaza, izoamilaza)	α-Dextrin-6-glucanohidrolază Sucroză-α-D-glucohidrolază	E.C.3.2.1.41 E.C.3.2.1.68	1,6-α-Glicozidică 1,6-α-Glicozidică din pullulan 1,6-α-Glicozidică din zaharoză şi maltoză

Utilizarea separată a preparatelor enzimatice amilazice conţinând una dintre enzimele menţionate anterior conduce la o hidroliză incompletă a amidonului. Datorită condiţiilor diferite în care acţionează fiecare enzimă şi a substratului specific pe care îl atacă, în majoritatea cazurilor, hidroliza enzimatică a amidonului se efectuează practic în două etape:

– în prima etapă are loc o fragmentare rapidă a macromoleculelor de amiloză şi amilopectină până la fracţiuni cu greutăţi moleculare mai mici – dextrinele (operaţia se numeşte dextrinizare). Această etapă se realizează cu preparate enzimattice α-amilazice;
– în a doua etapă, dextrinele sunt hidrolizate complet la oligozaharide şi apoi la maltoză şi glucoză în funcţie de compoziţia preparatului utilizat (operaţia se numeşte zaharificare). Această etapă se realizează cu preparate enzimatice conţinând celelalte 3 tipuri de enzime (β-amilază, amiloglucozidază, glucozidaze). Astfel, toate preparatele comerciale *α-amilazice* produc numai o hidroliză parţială

a amidonului, până la un grad de circa 20–30%, faza a doua realizându-se cu alte tipuri de amilaze (numite impropriu "β-amilaze" deşi se ştie că sunt un amestec de mai multe enzime).

Acţiunea hidrolitică a amilazelor asupra amidonului se recunoaşte prin două semne exterioare: în prima etapă (dextrinizare) amidonul se lichefiază (se fluidizează), această fază purtând şi denumirea de "lichefiere" şi, apoi, în etapa a doua (zaharifcare) se dizolvă în apă.

Un alt criteriu de stabilire a gradului de hidroliză a amidonului poate fi pus la punct prin determinarea conţinutului în glucide reducătoare, printr-o metodă oarecare. După acţiunea α-amilazelor, concentraţia în glucide reducătoare este de aproximativ 1/3 din concentraţia iniţială a amidonului; după etapa a doua de hidroliză efectuată cu β-amilaze, dacă hidroliza este completă, concentraţia în glucide reducătoare este egală cu cea a amidonului (supus iniţial procesului de hidroliză).

12.2. TEHNOLOGII DE BIOSINTEZĂ A α-AMILAZELOR

α-Amilaza este o enzimă ce face parte din clasa hidrolazelor şi anume, conform clasificării I.U.B., din grupul "glicozidaze" 3.2.1.

Microorganismele cele mai utilizate pentru biosinteza α-amilazelor sunt bacteriile şi fungii, astfel încât se deosebesc α-amilaze bacteriene şi fungice.

12.2.1. Biosinteza α-amilazelor bacteriene

α-Amilazele bacteriene hidrolizează parţial amidonul, păstrând configuraţia α a atomului anomeric de carbon în produşii de reacţie. Fragmentele de amidon rezultate în urma hidrolizei se numesc dextrine. Operaţia de hidroliză cu α-amilaze se numeşte dextrinizare. În industrie, această operaţie se mai numeşte fluidificare, datorită fenomenului de fluidificare a suspensiei de amidon, la sfârşitul operaţiei.

12.2.1.1. Microorganisme producătoare de α-amilaze

În general, α-amilazele bacteriene sunt enzime termostabile. Cea mai importantă sursă de α-amilază bacteriană o constituie speciile din genul *Bacillus* şi anume *Bacillus subtilis* şi *Bacillus amyloliquefaciens*. Aceste tulpini produc α-amilaze cu proprietăţi similare, dar cu reacţii imunologice diferite. Primele preparate comerciale apărute pe piaţă conţineau enzime bacteriene produse de aceste specii. Mai târziu au apărut preparate enzimatice conţinând enzime cu înaltă termostabilitate produse de speciile *B. licheniformis* şi *B. stearothermophilus*.

Tabelul 12.2

Preparate comerciale de amilaze bacteriene şi fungice

Denumirea comercială	Tipul de enzimă şi sursa	Forma de prezentare	*p*H optim de acţiune	Temperatura optimă,°C (sau domeniul)	Activitatea (unităţi proprii)	Aplicaţii şi însuşiri speciale
1	2	3	4	5	6	7
Nervanase	α-Amilază bacteriană, *Bacillus subtilis*	Pudră/ Lichid	5,8	75...90	300–10 000 SKB/g	Conversia amidonului
Amylozyme	α-Amilază fungică *Aspergllus oryzae*	Lichid/ Pudră	5,5	60...65	30 000 SKB/g 450–6000 SKB/g	Zaharificare maltozică
Ambazyme	Amiloglucozidază fungică *Aspergillus niger*	Lichid/ Pudră	4,7	63...70	50–120 AG/g	Siropuri de amidon, dextroză, industria alimentară
β-Glucanase	β-Glucanază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid	7	55...70	200 BGU/g	Industria alimentară, prepararea berii
β-Glucanase	β-Glucanază fungică, *Penicillum emersonii*	Lichid/ Pudră	4	30...90	200 şi 750 BGU/g	Industria alimentară, prepararea berii
Allcoholase I	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră	6,5	77	200 unităţi	Conversia amidonului

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 12.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Allcoholase II	Amiloglucozidază fungică *Rhizopus niveus*	Pudră	3,5–4,0	30…50	400 unități	Criotolerant pentru fermentația alcoolică
Sbozzimante SPC	α-Amilază bacteriană	Lichid	6,5	70	60 000 unități	Industria textilă
Canalpha	α-Amilază bacteriană	Lichid/ Pudră	5,5–6,5	75…85	–	Lichefierea amidonului
Bioferm	α-Amilază fungică	Lichid	4–5	40…50	–	Zaharificare dextrogenică
Amylo	Amiloglucozidază fungică	Lichid/ Pudră	4–5	55…65	–	Zaharificare alcoolică
Bioglucanase	β-Glucanază	Lichd/ Pudră	4–6	65…75	–	Industria berii
Biase	α-Amilază și β-amilază	Lichid/ Pudră	5–7	60…75	–	Industria farmaceutică, alimentară
Rhozyme GC2x; 86L H39	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră	5–7	80	12 500–210 000 FM	Industria alimentară, textilă
Spezyme	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Pudră	–	–	–	–
Spezyme	Amiloglucozidază fungică	Pudră	–	–	–	–

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 12.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Amylase THC	α-Amilază bacteriană	Pudră	7–8	60…70	–	Industria detergenților
Bactamyl-Rapidase	*Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră	–	70	–	Industria textilă
Dexlo		Lichid/ Pudră	6,5	85…90	–	Industria amidonului
Maxamyl		Lichid	6,5	85…90	–	Industria amidonului
Brewer's Amyliq		Lichid	6,5	70	–	Industria berii
Amylase P	α-Amilază fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră	–	–	500–500 000 PS_{50}/g	Industria de panificație
Filtrase AM	Glucanaze bacteriene *Bacillus subtilis*	Pudră	6,8	44	–	Industria berii
Maxatase M	Amilaze și proteaze bacteriene *Bacillus subtilis*		9–10	50…70	–	Industria de detergenți
Brewer's Mylase SR	α-Amilază și amiloglucozidază	Pudră	5,2	50…52	25 000 PS_{50}/g	Industria berii
Pamylase	α-Amilază și protează fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră	–	–	–	Industria de panificație
Agidex	Amiloglucozidaze fungice *A. niger*	Lichid	4,5	60…65	3000–8000 Unit.Glaxo/ml	Conversia amidonului
Barley β-glucanase	Glucanaza fungice *Penicillium emersonii*	Lichid	4,0	65…95	200 Unit.Glaxo/ml	Industrii fermentative

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 12.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Godo-BXA	α-Amilază bacteriană	Pudră	5,6	80	20 000 G/g	Calciu: pentru stabilitate termică; industria amidonului
MKC α-amilase, Amylase HT Series	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Pudră	5,0–7,5	Peste 90	Concentrată 2 100 000 MWU/g 700 000 MWU/g 30 000 MWU/g	Bere, panificație, distilare, furajarea animalelor, textile, hârtie, farmacie, fermentații
MKC α-Amilase L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Bere, panficație, furajarea animalelor, farmacie, fermentații
Optiamyl-L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Industria amidonului
Optimash-L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Distilare
Optisize-L	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90	420 000 MWU/g	Textile
Amylase-LP	*Bacillus subtilis*	Lichid	5,0–7,5	Peste 90		Industria hârtiei
MKC Amylase LT	*Bacillus lchenformis*	Lichid	5–8	90…105	420 000 MWU/ml	Furajarea animalelor, bere, textile, hârtie, farmacie, fermentații
MKC Fungal Amylase Clarase	α-Amilază fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră Lichid	4,0–6,6	Peste 60	40 000 SKB/g 5000 SKB/g 40 000 SKB/ml	Panificație, sucuri de fructe, industria amidonului
MKC Dextrinase A	-	Pudră	5–5,3	55	Pudră standardizată	Industria amidonului, conversia siropului acid la 62-65DE glucoză/ maltoză sirop
MKC Glucoamylase	Amiloglucozi-daze fungice *Aspergillus niger*	Lichid	3,8–4,5	55…60	200 GAU/ml 150 GAU/ml 160 GAU/ml 100 GAU/ml	Panificație, industria amidonului, berii, textilă, hârtiei, furajarea animalelor, farmacie, fermentații

Tabelul 1.2.2 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7
Takamine fungal amylase	α-Amilază fungică *Aspergillus oryzae*	Pudră Lichid	4,0–6,6	peste 60	40 000 SKB/g 5000 SKB/g 40 000 SKB/ml	Panificație
Takamyl	α-Amilază fungică *Aspergilus oryzae*	Pudră	4,0–6,6	peste 60	40 000 SKB/g	Panificație, sucuri de fructe, distilare, industria berii, amidonului
Diazyme	Amiloglucozidaze fungice *Aspergillus niger*	Lichid	3,8–4,5	55...60	200 GAU/ml 150 GAU/ml 100 GAU/ml 160 GAU/g	Panificație, industria amidonului, distilare, furajarea animalelor, industria textilă, hârtiei, farmacie, fermentații
Aquazym BAN	α-Amilază bacteriană *Bacillus subtilis*	Lichid/ Pudră/ Granule	6–7	70	120–1000 KNU/g	Alcool, panificație, bere, detergenți, alimente, hârtie, industria amidonului și textilă
Termamyl	*Bacillus licheniformis*	Lichid/ Granule	6–7,5	90...105	60 și 120 KNAAU/g	Alcool, bere, detergenți, alimente, hârtie, industria amidonului, zahărului, textilă
Fungamyl	α-Amilaze fungice *Aspergllus oryzae*	Lichid/ Pudră	5	55	180–1600 FAU/g	Alcool, panificație, bere și industria amidonului
Cereflo	β-Glucanază bacteriană *Bacillus subtlis*	Lichid	6,5–7,5	55...60	200 BGU/g	Bere, alimentație
Finizym	β-Glucanază fungică *Aspergillus niger*	Lichid	5	60	200 BGU/g	Bere, alimentație

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diferențele dintre α-amilazele produse de *Bacillus amyloliquefaciens* și cele produse de *B. licheniformis* constau în compoziția diferită a hidrolizatului de amidon obținut cu aceste enzime. Astfel, primul conține maltohexoze drept component major, iar în al doilea caz se obține un amestec de maltohexoze și maltoză.

În mod asemănător, în funcție de specia bacteriană utilizată în procesul de bosinteză, compoziția în oligozaharide a produsului de reacție este diferită, deși, per global, gradul de hidroliză calculat prin determinarea cantității de glucide reducătoare obținute în urma hidrolizei enzimatice raportate la cantitatea totală de substrat (amidon) utilizat este aproximativ același (20–25%).

În 1983, Fogarty a efectuat o recenzie completă a enzimelor microbiene care hidrolizează amidonul (tabelul 12.2).

12.2.1.2. Influența etapelor de cultivare a microorganismelor asupra biosintezei α-amilazei

Când tulpina producătoare este cultivată în sistem discontinuu, enzima este produsă în mod normal după ce a atins faza maximă de creștere și începe faza staționară. S-au postulat diferite ipoteze privind asocierea fazei de sporulare cu schimbările fiziologice. S-a constatat că, în timpul biosintezei enzimei, are loc o represie prin catabolit, astfel încât nivelul de producere a enzimei este limitat de concentrația sursei de carbon. În 1975, Saito și Yamamoto au demonstrat inducerea formării enzimei de către amidon concomitent cu represia prin catabolit la *B. licheniformis*. Ei au selecționat mutanți rezistenți la represia prin catabolit. În 1984, Vortruba și colaboratorii au găsit că producerea α-amilazei în sistem continuu este proporțională cu viteza de creștere și este represată de concentrația în glucide reducătoare.

În final, majoritatea autorilor au acceptat ideea că biosinteza α-amilazelor are loc la sfârșitul fazei logaritmice, înainte de atingerea fazei staționare.

Producerea α-amilazelor cu tulpini de *Bacillus subtilis* este influențată de particularitățile morfo-fiziologice corelate cu potențialul productiv al tulpinii. Tulpinile de *Bacillus subtilis* prezintă fenomenul de disociere *R - S, P, M* în anumite condiții. Forma *R* tipică este activă cu potențial enzimatic ridicat, în timp ce formele *S, P, M* sunt slab active sau inactive. Aceasta impune o limitare a variabilității, prin selecția permanentă a coloniilor de tip *R* înalt productive, evitarea repicărilor repetate și utilizarea de inocul preparat de fiecare dată din cultura stoc.

Dinamica acumulării α-amilazei în culturi submerse, în sistem discontinuu, este reprezentată în fig. 12.3, 12.4 și 12.5.

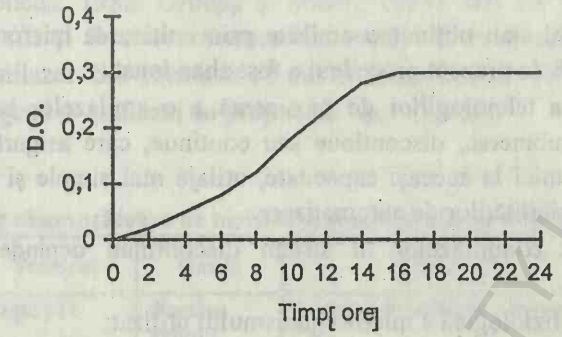


Fig.12.3. Dinamica acumulării de biomasă în culturi submerse de *Bacillus subtilis*.

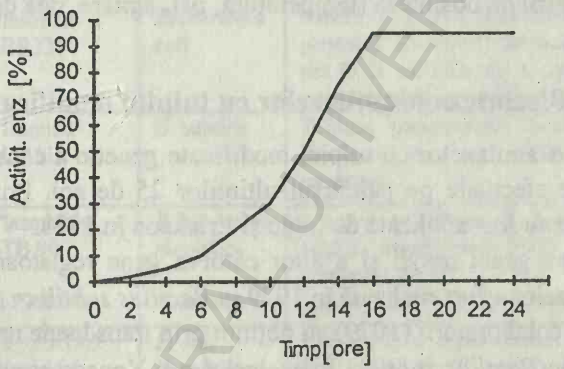


Fig.12.4. Dinamica activității enzimatice în culturi submerse de *Bacillus subtilis*.

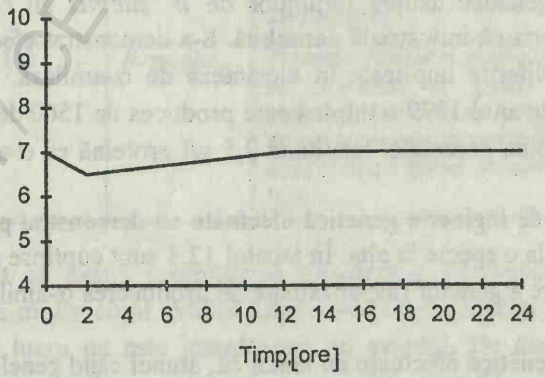


Fig.12.5. Evoluția *p*H-ului în culturi submerse de *Bacillus subtilis*.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

12.2.1.3. Biosinteza α-amilazelor în sistem discontinuu submers

Deşi, iniţial s-au obţinut α-amilaze prin cultivarea microorganismelor în culturi de suprafaţă, în prezent procedeul a fost abandonat.

Majoritatea tehnologiilor de biosinteză a α-amilazelor bacteriene au la bază procedeele submerse, discontinue sau continue, care asigură productivităţi sporite, suprafeţe mici la aceeaşi capacitate, utilaje mai simple şi exploatare mai uşoară datorită posibilităţilor de automatizare.

Biosinteza α-amilazelor în sistem discontinuu depinde de următorii parametri:

- starea fiziologică a microorganismului utilizat;
- potenţialul productiv al tulpinii folosite;
- compoziţia mediului de biosinteză;
- parametrii de bosinteză (temperatură, *p*H, agitare, rată de aerare, durata cultivării).

12.2.1.4. Biosinteza α-amilazelor cu tulpini modificate genetic

Obţinerea α-amilazelor cu tulpini modificate genetic a constituit subiectul unor studii intense efectuate pe parcursul ultimilor 25 de ani. Primele studii cu tulpini recombinate au fost analizate de Ingle şi Erickson în 1978.

Identificarea genei *amy*E şi a altor câtorva gene reglatoare implicate în producere α-amilazelor a fost realizată în 1979 la *Bacillus subtilis*.

Namura şi colaboratorii (1979) au obţinut prin transducţie un fag conţinând gena α-amilazei din *Bacillus subtilis*. În acelaşi timp, Yoneda şi colab. (1979) au utilizat un fag pentru a transfera gena pentru producerea de α-amilază de la *B. amyloliqefaciens* la o mutantă de *B. subtilis* care nu sintetiza α-amilază.

Studiile genetice asupra tulpinilor de *B. subtilis* au continuat, întrucât acestea au o importanţă industrială deosebită. S-a demonstrat efectul sinergic a cel puţin şase gene diferite implicate în biosinteza de α-amilază. Hitotsuyamagi şi colab. au obţinut în anul 1979 o tulpină care producea de 1500 de ori mai multă α-amilază decât tulpina parentală, rezultând 2,5 g/l proteină ca α-amilază în mediul de cultură.

Lucrările de inginerie genetică efectuate au demonstrat posibilitatea transferării genelor de la o specie la alta. În tabelul 12.3 sunt cuprinse date referitoare la lucrările de clonare a genelor răspunzătoare de producerea α-amilazei, la tulpini de *Bacillus spp.*

Studiile genetice efectuate au arătat că, atunci când genele α-amilazei sunt clonate în *E. coli*, ele se exprimă, enzima acumulându-se în spaţiul periplasmatic.

În general, celulele de *Bacillus subtilis* transformate biosintetizează eficient şi secretă α-amilaze de la alte specii. Cu toate acestea s-a constatat o exprimare slabă a genei din *B. sterothermophilus* în *B. subtilis* (Aiba şi colab.,

1983). De obicei, genele structurale pentru α-amilază sunt localizate în ADN-ul cromozomal (Yoneda, 1982, Ortlepp şi colab., 1983), dar s-a găsit că anumite tulpini de *B. subtilis* şi *B. stearothermophilus* conţin în mod natural plasmide ce conţin gena α-amilazei. S-a constatat că diferitele enzime produse de tulpini care au în cromozom gena α-amilazei au proprietăţi uşor diferite.

Tabelul 12.3

Clonarea genelor răspunzătoare de biosinteza α-amilazelor la tulpini de *Bacillus spp.*

Donorul	Vectorul	Gazda	Observaţii	După
Bacillus subtilis	Fagul p11	*Bacillus subtilis*	Detectarea calitativă a expresiei	Nomura şi colab., 1979
Bacillus amyloliquefaciens *B. coagulans*	Fagul φ 3T Fagul λ NM781 Plasmida pBR322	*B. subtilis* *Escherichia coli*	Plasmida purtând gena care a produs mărirea de 320 de ori a producerii de enzime prin transfer în *E. coli*. Enzima periplasmică s-a clonat de asemenea în *B. subtilis*, dar a produs mici schimbări ale producţiei	Yoneda şi colab., 1979 Colson şi colab., 1981
Bacillus amyloliquefaciens	Plasmida pUB110	B. subtilis	Tulpina transformată produce de 5 ori mai mult decât cea parentală.	Palva, 1982
B. stearothermophilus	Plasmidele pTB 90 şi PTB 53	*B.stearothermophilus* *B. subtilis*	A mărit activitatea de 5 ori a tulpinii transformate de *B. stearothermophilus* Exprimare slabă în *B. subtilis*	Aiba şi colab., 1983
B. licheniformis	Fagul XL47 Plasmida pBR322, pUB110	*E. coli* *B. subtilis*	Clonare în *E. coli* utilizând fag. Subclonare din *E. coli* în plasmide pentru transformarea lui *B. subtilis*	Joyet şi colab., 1984
B.amyloliquefaciens	pUB110	*B. subtilis*	Brevetat pentru copii multiple ale plasmidei	Palva, 1984
B.amyloliquefaciens	pUB110	*B. subtilis*	Plasmidă conţinând promotorul de α-amilază al gazdei şi semnalul secvenţelor; utilizat, de asemenea, pentru exprimarea altor proteine alături de α-amilază.	Ulmanen şi colab., 1985

S-a dovedit că există posibilitatea transferării interspecifice a genei şi multiplicării în mai multe copii. Multe tulpini secretă în acelaşi timp amilaze şi proteaze, dar acest lucru nu este întotdeauna un avantaj. De asemenea, dacă se transferă gena termostabilă α-amilazei la tulpini mezofile producătoare de proteaze, este posibil să se aplice un tratament simplu de încălzire a produsului brut, pentru a inactiva proteaza, fără a afecta termostabilitatea α-amilazei. Acest fapt a fost ilustrat prin transferul genei de la *B. licheniformis* la *B. subtilis*. De

asemenea, s-au clonat fragmente de ADN din *B. subtilis* sau din *B. amyloliquefaciens* şi s-au utilizat pentru mărirea cantităţii de α-amilază secretată.

În general, genul *Bacillus* produce α-amilaze, dar s-a găsit o enzimă din *B. stearothermophilus* care acţionează mai mult ca o β-amilază decât ca o α-amilază.

12.2.1.5. Compoziţia mediului şi parametrii de biosinteză

Biosinteza α-amilazelor este influenţată de compoziţia mediului nutritiv şi de condiţiile de cultivare a microorganismului (temperatură, *p*H, durata fermentaţiei). Ca sursă de carbon se pot utiliza diferite varietăţi de amidon (tabelul 12.4). Cele mai bune rezultate se obţin în cazul utilizării glicogenului şi a maltotetraozelor. Maltotriozele sunt, de asemenea, utilizate. Dintre dizaharide, maltoza este utlizată, dar rezultatele sunt de cinci ori mai slabe decât în cazul utilizării glicogenului ca sursă de carbon. Dacă se utilizează monozaharide, se obţin cantităţi foarte mici de α-amilază.

Sursele de azot folosite sunt universale: săruri de amoniu, aminoacizi, caseină. Pentru *B. coagulans* se indică un mediu de cultură deosebit faţă de celelalte. De asemenea, pentru *B. licheniformis* s-a găsit că 3 vitamine şi 7 aminoacizi sunt necesari pentru producerea α-amilazei în condiţii optime. Biosinteza de enzime a unei tulpini variază mult în funcţie de mediul utilizat. De exemplu, o tulpină de *B. subtilis* produce mai multă protează decât α-amilază, dacă este cultivată pe un mediu cu făină de peşte sau şrot de soia. Dacă se foloseşte un mediu pe bază de amidon, atunci este indusă biosinteza α-amilazei. Dacă în mediu este prezentă glucoza, aceasta are un efect puternic represor, inhibând parţial sau total biosinteza α-amilazei.

În biosinteza amilazelor şi proteazelor un rol important îl au ionii de calciu şi amoniu, datorită implicării lor în sinteza acidului dipicolinic, intermediar în biosinteza acestor enzime. Ionii de calciu au, de asemenea, un rol important în stabilizarea enzimelor.

În ceea ce priveşte temperatura de cultivare, aceasta variază de la o specie la alta, fiind în general cuprinsă între 30 şi 37°C pentru *B. subtilis* şi între 50 şi 65°C pentru *B. coagulans* şi *B. stearothermophilus* (tabelul 12.4).

Pentru toate tulpinile producătoare de amilaze (tabelul 12.4), *p*H-ul optim variază între 6,0 şi 7,5. Acesta poate fi controlat şi menţinut constant pe toată durata biosintezei. Prezenţa proteinelor în mediu îmbunătăţeşte capacitatea de tamponare a mediului şi *p*H-ul se menţine relativ constant.

Biosinteza α-amilazei este un proces intens aerob, iar oxigenul insuflat o dată cu aerul sterilizat nu poate fi utilizat direct în fază gazoasă, ci numai ca oxigen dizolvat. Necesarul de oxigen solvit depinde de microorganism şi mai ales de faza de dezvoltare în care se află acesta, intensitatea maximă de respiraţie situându-se în

timpul fazei logaritmice. Cantitatea de oxigen este cu atât mai mare cu cât durata de generaţie este mai mică (fig. 12.6).

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI FIZICA

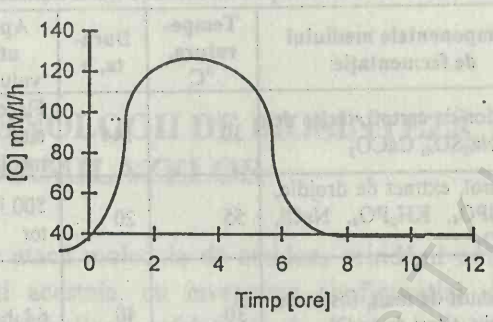


Fig.12.6. Variaţia concentraţiei de O_2 dizolvat pe parcursul biosintezei.

Din acest motiv, biorectoarele sunt echipate cu sisteme de agitare eficiente pentru a asigura un transfer de masă al oxigenului cât mai bun. Aerul sterilizat în prealabil se insuflă sub o uşoară presiune pentru prevenirea contaminărilor.

Pentru bosinteza α-amilazei necesarul de aer este:

120 mM/l/h = 0,0224 l/l/h = 1,44 l/l/h

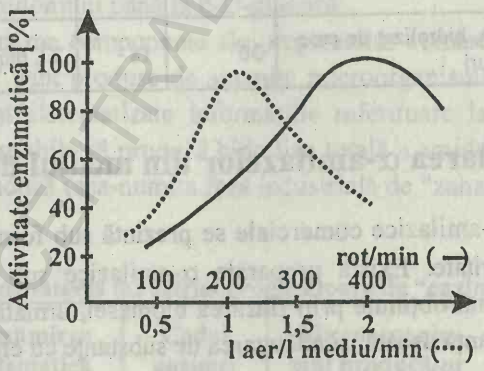


Fig.12.7. Influenţa agitării şi a debitului de aer asupra biosintezei α-amilazei cu *B. subtilis*.

Proprietăţile fizico-chimice ale mediului de cultură, care influenţează boisinteza α-amilazelor, sunt: vâscozitatea, tendinţa de spumare. Vâscozitatea influenţează consumul de energie necesar agitării. Creşterea vâscozităţii mediului de cultură are ca efect scăderea transferului de oxigen şi diminuarea biosintezei de α-amilază.

Tabelul 12.4

Compoziția mediului de fermentație și condițiile de cultivare ale câtorva bacterii producătoare de α-amilază

Specia	Componentele mediului de fermentație	Temperatura, °C	Durata, h	Aparatura utilizată, volum mediu	După
Bacillus licheniformis	Amidon de cartofi, tărâțe de orz, Na_2SO_4, $CaCO_3$	30	144	Flacoane agitate, 100ml mediu	Outtrup, 1972
B. coagulans	Glicerol, extract de drojdie, Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NaCl, $CaCO_3$	55	20	500 l, bioreactor	Smalley, 1972
B. subtilis	Orz, must de malț, fosfat de amoniu, citrat de sodiu	30	40	6 l, bioreactor	Markkanen and Bailey, 1974
B. stearothermophilus	Amidon de porumb, peptonă, extract de porumb, săruri	55...65	40–72	flacoane agitate, 50 ml	CPC, International Inc. 1979
B. licheniformis	Amidon, peptonă, săruri, aminoacizi, vitamine	48	24	flacoane agitate, 30 l, bioreactor	Chandra, 1980
B. subtilis	Amidon, extract de porumb, sulfat de amoniu, fosfat de potasiu	30	18	2 l, bioreactor	Baig, 1984
B. subtilis	Amidon, hidrolizat de cazeină, săruri	30	18	2 l, bioreactor	Pazlarova, 1984

12.2.2. Izolarea α-amilazelor din mediul de biosinteză

Preparatele α-amilazice comerciale se prezintă sub formă condiționată cu grade diferite de puritate. Există preparate α-amilazice sub formă de soluție concentrată și stabilizată obținute prin filtrarea biomasei, urmată de o concentrare până la cca 50% substanță uscată, și adăugarea de substanțe cu efect stabilizant.

Un preparat α-amilazic de puritate mai mare se poate obține astfel: lichidul perfect limpede obținut în urma filtrării este supus operației de concentrare până la 1/5 din volum și enzima este precipitată cu acetonă în proporție de 50%. Preparatul obținut se spală cu acetonă rece și se usucă corespunzător. În industrie, pentru hidroliza amidonului se utilizează preparate α-amilazice parțial purificate obținute în modul arătat anterior.

Preparatele de α-amilază destinate folosirii în zootehnie se obțin prin atomizarea integrală a mediului de cultură, deci conțin și ingredientele din acesta, rămase nemetabolizate.

În vederea obținerii unor preparate enzimatice de înaltă puritate se aplică metode specifice de purificare a enzimelor (cromatografie cu schimbători de ioni, cromatografie de afinitate etc.).

12.3. TEHNOLOGII DE BIOSINTEZĂ A β-AMILAZELOR

β-Amilazele atacă molecula de amidon, scindând unități de maltoză din capătul reducător al acesteia, cu inversarea configurației atomului de carbon anomeric în timpul hidrolizei astfel încât, în final, rezultă β-maltoză. În mod tradițional, aceste enzime sunt extrase din orz sau din malțul de orz și se găsesc și în alte semințe, cum ar fi soia. β-Amilazele de origine microbiană au devenit comerciabile abia în ultimul timp.

De obicei, β-amilaza (E.C.3.2.1.2), cu denumirea ei științifică α-1,4-gluconmaltohidrolaza, este produsă de către microorganisme, alături de α-1,6-glucozidaze (E.C.3.2.1.4.1 sau E.C.3.2.1.6.8) și de amiloglucozidază (E.C.3.2.1.3). Preparatele enzimatice parțial purificate conțin și aceste enzime, astfel explicându-se faptul că sunt atacate și legăturile α-1,6 din amilopectină, iar în final are loc hidroliza totală a amidonului până la β-D-glucoză.

Cele trei enzime componente ale preparatelor comerciale denumite "enzime de zaharificare" sunt produse de anumite microorganisme în diferite cantități. În tabelul 12.5 sunt sistematizate informațiile referitoare la producerea celor 3 tipuri de amilaze, capabile să producă hidroliza totală a amidonului lichefiat (cu α-amilază) până la glucoză (așa-numita fază industrială de "zaharificare").

Tabelul 12.5

Microorganisme de interes industrial producătoare de "enzime de zaharificare"

Denumirea comercială a enzimei	Denumirea sistematică	Codul enzimei	Microorganismul producător	După
1	2	3	4	5
β-Amilază	α-1,4-Glucon maltohidrolază	E.C. 3.2.1.2.	*Bacillus polymyxa*	Robyt and French (1964) Griffin and Fogarty (1973)
			Bacillus circulans	Napier (1977)
			Bacillus negaterium	Higashihara and Osada (1974)
			Bacillus cercus var. mycoides	Takasaki (1976)

Tabelul 12.5 (continuare)

1	2	3	4	5
Amylogluco zidază (glu-coamilază)	α-1,4-Glucon glucohidrolază	E.C. 3.2.1.3.	*Aspergillus niger*	Aunstrup (1967) Lasater, Smith (1979) Svensson (1982)
			Aspergillus awa-mori	Flor and Hayashida (1983)(24)
			Clostridium ther-moamylolyticum	Katkocin ş.a. (1985)
			Halobacterium sodomense	Oren (1983)
Glucozida-zele	α-1,6-Glucozi-daze	E.C.	*Aerobacter (Klebsiella) aerogenes*	Bulich (1978) Takizawa and Mu-rooka (1985)
			Bacillus acido-pullulyticus	Nielsen (1982)(30)
			Pseudomonas	Harada (1968)
			Bacillus stearo-thermophilus	Suzuki and Imai (1985)

12.3.1. Tulpini modificate genetic, producătoare de β-amilaze

Selecția de tulpini producătoare de β-amilaze a constituit o preocupare permanentă în domeniu. Gena β-amilazei din *B. cereus* a fost clonată în *Escherichia coli*, utilizând un vector plasmidial, dar tulpina gazdă a produs un nivel scăzut în enzimă (Colson, 1981). În anul 1984, Outtrup și Norman au descoperit o amilază maltogenică termostabilă într-o tulpină de *Bacillus stearothermophilus*. Tulpina parentală era dificil de cultivat în scopul producției de enzimă.

Utilizând tehnica ADN-recombinant s-a introdus gena amilazei într-o plasmidă potrivită pentru clonări în *B. subtilis*, utilizând *Escherichia coli* ca o gazdă intermediară. Astfel s-a obținut o tulpină de *B. subtilis* transformată, care a fost cultivată la flacoane agitate la 30°C, utilizând un mediu pe bază de amidon, făină de soia, fosfat de sodiu și a biosintetizat de 10–20 ori mai multă amilază decât tulpina parentală de *B. stearothermophilus* cultivată pe un mediu puțin diferit la 50°C (Outtrup și colab., 1984). Producția tulpinii transformate a fost de 200 EU/ml mediu de cultură, determinată la 50°C, *p*H = 5,5 și are o importanță comercială deosebită. După cum se vede, enzima are avantajul că acționează la o temperatură mai ridicată decât celelalte enzime de zaharificare conținute în alte produse comerciale.

12.3.2. Amiloglucozidaze

Amiloglucozidaza (glucoamilaza) atacă extremităţile nereducătoare ale amidonului şi pune în libertate β-glucoză. Ea atacă, de asemenea, încet, legăturile α-1,6- din amilopectină, astfel încât se poate obţine cantitativ glucoză, din soluţii diluate de amidon. Această enzimă se utilizează împreună cu α-amilaza şi glucozizomeraza, la obţinerea siropului de glucoză şi fructoză din amidon. Se utilizează, de asemenea, în industria berii pentru mărirea fermentabilităţii materiilor prime vegetale. Alături de proteazele pentru detergenţi, amiloglucozidazele sunt enzime de mare tonaj. Ele sunt produse în fermentatoare mari de aproximativ 100 m^3 capacitate şi cantităţile de ordinul a zeci de mii de tone de soluţie concentrată conţin numai câteva procente de enzimă-proteină activă. Câteva milioane de tone de amidon sunt prelucrate anual cu ajutorul acestor enzime (Norman, 1981).

Mediile de cultură pentru aceste enzime conţin, în general, 5–20% făină de porumb, iar uneori se suplimentează cu amidon de porumb sau extract de porumb. Un astfel de mediu poate să nu mai conţină alte ingrediente. *p*H-ul se menţine la valoarea 5,5 cu soluţie de NH_3 sau NaOH. Dworschack şi Nelson (1972) au demonstrat că producţia în amiloglucozidaze creşte cu 60%, dacă se adaugă săruri de amoniu la începutul fermentaţiei şi apoi se corectează *p*H-ul la valoarea 4 cu NaOH.

12.4. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A AMIDONULUI UTILIZÂND PREPARATE AMILOLITICE DE ORIGINE MICROBIANĂ

Studiul dinamicii hidrolizei amidonului de către sistemele enzimatice amilolitice produse de diferite microorganisme a demonstrat că procesul depinde de raportul diferitelor amilaze şi glucoamilaze, precum şi de activitatea oligozaharidazelor. Din acest motiv, fiecare producător de enzime stabileşte pentru hidroliza enzimatică a amidonului anumite condiţii de lucru în funcţie de compoziţia preparatului enzimatic amilolitic folosit şi de scopul urmărit.

Hidroliza amidonului cu ajutorul acizilor şi enzimelor este cunoscută încă de la începutul secolului al XIX-lea. Transformarea amidonului în glucoză prin procedeele curente cuprinde două faze distincte (indiferent de procedeul aplicat): *solubilizarea* (transformarea amidonului într-o formă solubilă) şi *hidroliza propriu-zisă* (în care procesul de degradare decurge până la molecula de glucoză).

Din punct de vedere al agentului de acţiune, procedeele de hidroliză se pot clasifica în:

– procedeul acid, în cele două faze utilizându-se acizi minerali;

– procedeul acid-enzimă: solubilizarea, lichefierea amidonului se fac cu acid, iar zaharificarea cu enzime β-amilazice;

– procedeul enzimă-enzimă: lichefierea suspensiei de amidon se face cu α-amilază, iar zaharificarea cu preparate β-amilazice.

Lichefierea şi zaharificarea enzimatică dau practic conversii cantitative ale amidonului la glucoză, dacă sunt aplicate consecutiv.

Lichefierea acidă şi zaharificarea enzimatică dau randamente de glucoză cu 5% mai mici dacât sistemul enzimă-enzimă, iar procedeul acid cu 12% mai mici decât în procedeul dublu enzimatic.

Dezavantajele hidrolizei acide sunt următoarele:

– obţinerea unui grad de puritate mic al hidrolizatului din cauza produşilor reversibili: hidroximetilfurfurol, acid levulic, acid formic;

– randament diminuat al hidrolizei din cauza produşilor secundari rezultaţi;

– apariţia unor procese de coroziune a instalaţiilor în care se desfăşoară procesul enzimatic.

Procedeele enzimatice se utilizează în prezent la fabricarea hidrolizatelor de amidon pentru obţinerea unor sortimente cu diverse proporţii între principalele componente: glucoză, fructoză, maltoză, dextrine.

Pentru efectuarea tratamentelor enzimatice s-au izolat microorganisme şi se produc – aşa cum s-a arătat – enzime specifice pentru fiecare din cele două faze şi anume: α-amilaza bacteriană termostabilă pentru procesul de solubilizare-dextrinizare şi β–amilaze pentru zaharificarea propriu-zisă.

În funcţie de scopul urmărit, suspensia de amidon supusă hidrolizei poate avea o concentraţie de 30–40% substanţă uscată (dacă soluţia obţinută se foloseşte la extracţia şi purificarea glucozei) sau 10–20% substanţă uscată (dacă soluţia obţinută se foloseşte la prepararea unor medii de fermentaţie, de exemplu în fermentaţia lactică sau fermentaţia alcoolică).

12.4.1. Parametrii de control ai hidrolizei enzimatice

Pentru studiul reacţiei de hidroliză enzimatică a amidonului este necesară definirea următorilor parametri:

– *S* – concentraţia substratului, exprimată în % amidon; conţinutul în amidon al materiei prime se determină o singură dată, la începutul experimentărilor, toate lucrările ulterioare fiind efectuate pe aceleaşi loturi de materii prime;

– *E/S* – concentraţia enzimei; raportarea cantităţii de enzimă la substratul utilizat este un parametru care trebuie specificat şi calculat pentru orice curbă

BCU IASI BIBLIOTECA UNIVERSITARA LIBRARY

enzimatică, acesta fiind elementul esențial de determinare a timpului de hidroliză, astfel încât să se atingă gradul de hidroliză dorit.

– *T* – temperatura reacției enzimatice este parametrul esențial, care se menține și se indică de fiecare dată;

– *p*H – determinarea *p*H-ului în mediul de reacție se efectuează inițial cât și pe parcurs;

– *GH* – gradul de hidroliză este definit ca raportul între cantitatea de amidon transformată în glucide reducătoare și cantitatea totală de amidon supusă hidrolizei:

$$GH = \frac{g}{g_{tot}} \cdot 100\%,$$

unde: g este conținutul în glucide reducătoare ale mediului de hidroliză; g_{tot} – conținutul în amidon al suspensiei de materie primă (făină de porumb, cartofi) supusă hidrolizei enzimatice.

Pentru un sistem dat se pot aproxima următoarele interdependențe între valorile raportului *E/S* și gradul de hidroliză:

– pentru un raport dat *E/S* timpul de atingere al unui anumit grad de hidroliză este independent de concentrația substratului;

– timpul de hidroliză până la un anumit grad este invers proporțional cu raportul *E/S*;

– timpul de hidroliză este invers proporțional cu activitatea enzimei.

Din acest motiv, la toate curbele trasate se specifică raportul *E/S*. Se menționează că acesta este diferit de concentrația enzimei în mediul de hidroliză, specificată de asemenea în experiențele respective.

12.4.2. Compoziția mediului de hidroliză

Pentru exemplificare, se prezintă în continuare modul de stabilire a condițiilor optime de hidroliză a amidonului din porumb, în scopul obținerii unei soluții de glucoză utilizabilă în fermentație lactică sau în cea alcoolică.

Pentru fermentația lactică este necesară obținerea unor soluții de glucoză și maltoză de concentrații cuprinse între 10–12%, astfel încât pentru hidroliză se pornește de la medii conținând circa 10–12% amidon. Soluțiile care au concentrații sub 10% sunt considerate neeficiente pentru fermentația lactică la faza de regim, dar sunt indicate pentru faza de inocul de laborator și inocul industrial, când pentru dezvoltarea rapidă și abundentă a unei culturi se recomandă soluții de 5–7% glucide reducătoare.

De fapt s-a constatat că în condiții de laborator, unde fenomenul evaporării este mai intens și mai greu de stăpânit, la concentrații mai mari de amidon se produce fenomenul de gomflare a pastei de amidon, ceea ce împiedică desfășurarea

în bune condiţii a operaţiei de hidroliză enzimatică; în cazul hidrolizei acid-enzimă, proporţia de amidon în mediu poate fi mărită până la 40%. Experienţele de hidroliză enzimatică efectuate cu soluţii de amidon cu diferite concentraţii (experimentele s-au realizat în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti) au stabilit raportul optim între cantitatea de materie primă (uruială de porumb sau de mălai superior) şi de apă pentru hidroliza enzimatică după cum urmează:

- varianta I: 50 g uruială de porumb; 200 ml apă distilată;
- varianta a II-a: 50 g mălai superior; 300 ml apă distilată.

S-a constatat că la raporturi mici între făina de porumb şi apă se produce adsorbţia apei de către granulele de amidon (gonflare) şi apariţia produselor de hidroliză este îngreunată. De asemenea, acest raport diferă în funcţie de gradul de măcinare a făinii de porumb şi de conţinutul în amidon. Pentru mălaiul superior este necesar un raport de 1:6 faţă de uruială, unde este suficient 1:4. La diluţii prea mari, păstrând acelaşi raport *E/S*, concentraţia enzimelor în soluţie devine insuficientă şi randamentul de hidroliză este mai mic.

Întrucât în compozia mediului de cultură utilizat în fermentaţia lactică este necesară şi adăugarea de săruri (sulfat de amoniu, fosfat diamoniacal, carbonat de calciu), pentru a evita sterilizarea separată a acestora s-a încercat efectuarea reacţiei de hidroliză enzimatică a făinii de porumb (uruială sau mălai superior) în prezenţa sărurilor respective. Rezultatele obţinute au demonstrat că reacţia enzimatică nu este afectată de prezenţa sărurilor (în concentraţiile respective), astfel încât adăugarea acestora se poate efectua chiar în faza de hidroliză.

Studii recente ale procesului de hidroliză a amidonului cu preparate α-amilazice microbiene au arătat că activitatea catalitică a enzimei scade exponenţial când concentraţia glucozei rezultate creşte peste 40% (fig. 12.8 şi 12.9).

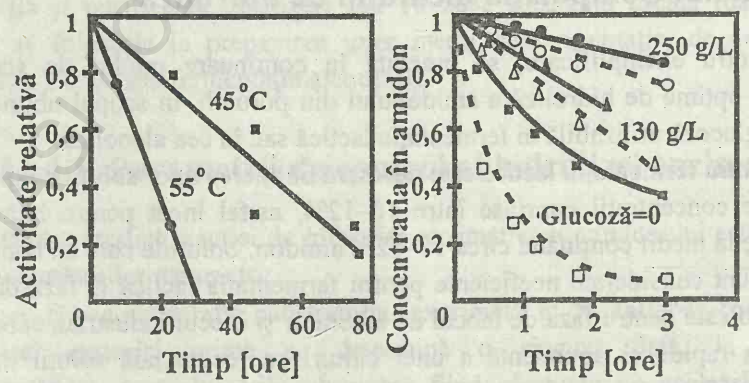


Fig. 12.8. Cinetica hidrolizei amidonului de grâu cu α-amilază bacteriană (□Δo) şi α-amilază din orz (■▲•): 8 g/l enzimă şi concentraţia relativă a amidonului raportată la concentraţia iniţială 30 g/l.

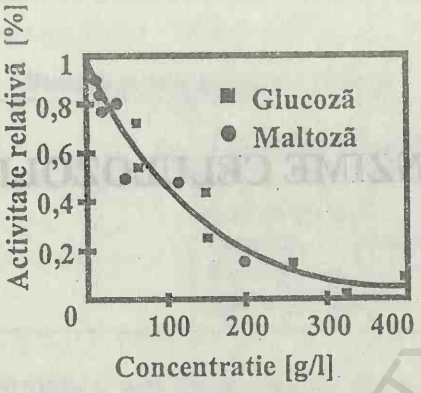


Fig. 12.9. Efectul de inhibiție exponențială a glucidelor asupra activității α-amilazei.

În fig. 12.8 sunt arătate experiențe de hidroliză a amidonului, efectuate cu diferite concentrații inițiale și două enzime de proveniență diferită: α-amilază bacteriană și extrasă din malț. Evoluția procesului de hidroliză s-a urmărit prin determinarea concentrației în glucoză, rezultate în urma reacției. Se observă o scădere exponențială a concentrației în glucoză chiar de la timpul zero. Din fig. 12.9 se observă că ambele glucide – glucoza și maltoza – au efect de inhibiție similar asupra procesului de hidroliză.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13 ENZIME CELULOZOLITICE

Biomasa lignocelulozică (BLC) constituită din reziduuri agricole (paie, coceni de porumb), unele subproduse ale industriei alimentare (pulpe epuizate de fructe, tăiței de sfeclă de zahăr epuizați), furajele și lemnele neutilizabile reprezintă o rezervă considerabilă și insuficient valorificată de glucide fermentescibile.

În ultimul deceniu s-au făcut eforturi considerabile în privința valorificării superioare a BLC. Orientarea principală a cercetărilor a fost transformarea prin fermentație a polizaharidelor constitutive, celuloza și hemiceluloza, și au apărut direcții de cercetare majore, ca hidroliza enzimatică a BLC, urmată de fermentația dirijată a produșilor rezultați (glucoza, pentoza). În prim planul obiectivelor vizate s-a aflat obținerea de carburant lichid, datorită debușeurilor resurselor disponibile.

Pentru hidroliza deșeurilor celulozice se utilizează, în general, procedee enzimatice sau procedee chimice, dar acestea din urmă au fost mai puțin agreate datorită efectului coroziv al agenților de hidroliză. Hidroliza enzimatică este preferată datorită condițiilor blânde în care poate avea loc și datorită specificității enzimelor față de anumite substraturi. Se folosesc în general enzime microbiene celulozolitice produse de diferite tulpini de microorganisme, ce produc în cantități apreciabile enzime care caracterizează hidroliza parțială sau totală a celulozei.

13.1. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE CELULAZE

Există multe tipuri de microorganisme care au capacitatea de a digera materiale celulozice fie parțial, fie total. Dintre acestea cele mai importante sunt bacteriile (tabelul 13.1) și fungii.

Bacteriile. Deși multe specii de bacterii sunt capabile să sintetizeze enzime celulozolitice, puține sunt cele care prezintă interes industrial.

FCU IAȘI / UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 13.1

Bacterii producătoare de celulaze

Bacterii termofile	*Clostridium thermocellum*
Bacterii mezofile	*Cellvilerio fulgus* *Pseudomonas fluorescens* *Ruminococcus sp.* *Cellulomonas sp.*

Bacteriile celulozolitice, atât Gram-pozitive cât şi Gram-negative, includ specii aerobe (din genul *Pseudomonas*), facultativ anaerobe (din genul *Cellulomonas*) şi strict anaerobe (din genul *Clostridium*).

Fungii. În timpul celui de-al doilea război mondial, Armata Statelor Unite ale Americii a suferit pierderi severe ale echipamentului şi uniformelor datorită atacului fungic în climatul cald şi umed din Pacificul de Sud. Fungii care au contribuit la acest dezastru au fost recoltaţi şi s-a alcătuit o colecţie, din care s-a izolat şi s-a caracterizat *Trichoderma reesei* (Reese şi Mandels, 1984). Tulpinile cunoscute sub această denumire (de fapt provenite din *Trichoderma viride*) constituie mucegaiul cel mai studiat şi probabil cel mai bun pentru biosinteza întregului sistem enzimatic celulozolitic. Cu toate acestea, se va exemplifica şi cu alte câteva specii de fungi care au fost selecţionate de diferiţi cercetători cu scopul declarat de a obţine buni producători de celulaze: *Trichoderma koningii*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium iriensis*, *Penicillium verruculosum*, *Fusarium solani*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* etc.

13.2. HIDROLIZA ENZIMATICĂ A CELULOZEI UTILIZÂND PREPARATE CELULOZOLITICE DE ORIGINE MICROBIOLOGICĂ

Substratul natural al celulazelor este celuloza. Ea constituie componenta principală a pereţilor celulei vegetale. Se găseşte adesea în plante sub formă de fibre. Fibra de celuloză este constituită din diferite straturi succesive ale căror proprietăţi fizico-chimice şi mecanice conferă fibrei funcţionalitatea sa specifică.

Din punct de vedere chimic, fibra vegetală cuprinde trei constituienţi principali – celuloza, hemicelulozele şi ligninele.

Celuloza. Este un polimer insolubil, liniar, format (alcătuit) din unităţi de glucoză legate între ele prin legături de tip β-1,4. Gradul de polimerizare este de

ordinul a 10 000 unități moleculă. În stare naturală aceste molecule sunt asociate într-o structură fibrilară sau cristalină.

Hemicelulozele. Sunt heteropolizaharide cu un grad de polimerizare mai mic și sunt mai ușor hidrolizabile decât celuloza. Constituienții principali sunt xiloza și arabinoza (majoritare), glucoza (întotdeauna prezentă în cantități mici). Hidroliza hemicelulazelor furnizează pentoze nefermentescibile cu formare de etanol de către *Sacharomyces cerevisiae*, dar sunt în curs de cercetare alte căi de valorificare ale acestor heteroglucide.

Ligninele. Sunt polimeri tridimensionali de origine fenolică. Legăturile între monomeri sunt de diferite tipuri, multe dintre ele nehidrolizabile enzimatic. Produșii de degradare ai ligninelor sunt practic nefementescibili.

Celuloza, hemicelulozele și ligninele în stare naturală sunt insolubile în apă, iar pe de altă parte nu sunt direct accesibile enzimelor celulozolitice datorită structurii cristaline și a diferitelor tipuri de legături care leagă cei 3 polimeri (forțe Van der Waals, punți de hidrogen, legături covalente). Datorită faptului că celuloza este practic "cimentată" de ceilalți doi polimeri, pentru o hidroliză cât mai completă se fac pretratări fizico-chimice ale biomasei ligno-celulozice cu vapori sub presiune, fie acide, fie alcaline.

Un substrat atât de complex ca BLC nu poate fi hidrolizat total de o singură enzimă. Sistemul enzimatic produs de *Tricoderma reesei* este, deci, un amestec de diferite enzime care cooperează între ele. Rezultatele cercetărilor efectuate au arătat că există două sisteme enzimatice principale, unul specific hemicelulozelor și altul specific celulozei. Mecanismul de acțiune al enzimelor care hidrolizează hemicelulozele este asemănător cu cel al celulozelor, dar specifitatea lor de substrat este net superioară ultimelor.

Sistemul enzimatic celulozolitic care hidrolizează celuloza este compus în principal din trei clase de enzime:

– ***exoglucanazele***, care atacă molecula de celuloză la capătul nereducător al lanțului eliberând resturi de celobioză; ele mai sunt deci numite celobiohidrolaze;

– ***endoglucanazele***, care operează aleatoriu în interiorul lanțului de celuloză, creând astfel situsuri de atac suplimentare pentru exoglucanaze;

– ***celobiazele*** (β-glucozidazele), care hidrolizează celobioza, dar în același timp și celotrioza și celotetroza cu formare de glucoză.

În interiorul fiecărei clase pot exista mai multe enzime, sub diferite forme de izoenzime. În general aceste enzime sunt glicoproteine, cu variații mari ale componentei glucidice. Atât endoglucanazele cât și exoglucanazele și β-glucozidaza au fost purificate din *Trichoderma reesei*.

Studiile de purificare şi fracţionare ale enzimelor din această subclasă au relevat faptul că toate cele 3 tipuri majore de enzime celulozolitice sunt biosintetizate de microorganisme în forme multiple, din care se pot izola un număr variabil de fracţiuni, atât în funcţie de natura mediului de cultură folosit cât şi de tehnicile utilizate.

Multe cercetări au demonstrat că diferite enzime acţionează în mod sinergic în hidroliza celulozei cu grad mare de polimerizare. Rolul β-glucozidazei în sinergismul reacţiei este uşor de explicat. În timp ce celobioza este un produs finit inhibitor al celobiohidrolazei, β-glucozidaza acţionează îndepărtând celobioza din amestecul de reacţie. S-a arătat că sinergismul dintre celobiohidrolază şi endoglucanază este foarte avansat în cazul substraturilor cu grad mare de polimerizare, mai slab în cazul substraturilor amorfe, cum este celuloza gonflată în prezenţă de acizi şi absent în cazul celulozelor solubile substituite (carboximetilceluloza).

Endoglucanaza acţionează asupra regiunilor amorfe din fibrele de celuloză deschizînd noi capete de lanţ pentru atacul exoglucanazelor care, apoi, îndepărtează unităţile de celobioză de la capetele nereducătoare ale lanţului. Sinergismul dintre cele două enzime rezultă aşadar din faptul că noul substrat (capetele libere ale lanţurilor) pentru exoglucanaze este format în urma acţiunii endoglucanazelor.

Pentru biosinteza de β-glucozidază, cele mai potrivite sunt tulpinile de *Aspergillus niger*, *A. phoenicis*, *A. wentii*, β-glucozidaza produsă de aceste microorganisme fiind mai puţin sensibilă la inhibiţia prin produs finit decât cea biosintetizată de *T. reesei*, motiv pentru care s-au iniţiat fermentaţii mixte.

În fermentaţiile mixte se obţin preparate cu activităţi enzimatice mari ale celor trei enzime menţionate anterior, ba chiar şi pentru xilanaze, atunci când tulpina de *Aspergillus* este introdusă în fermentaţie la 15 ore de la începerea fermentaţiei cu tulpina de *Trichoderma*. Dezvoltarea tulpinii de *Trichoderma* este restricţionată de aciditatea puternică a mediului produsă de tulpina de *Aspergillus*.

13.2.1. Procedeul I.F.P. de transformare a biomasei ligno-celulozice

Procedeul studiat la "Institut Francais du Petrol" (I.F.P.) şi dezvoltat în ultimul deceniu are ca obiectiv hidroliza enzimatică a BLC şi fermentaţia zaharurilor obţinute, la acetonă-butanol (ABE). În fig. 13.1 sunt schematizate principalele etape ale procedeului I.F.P. Biomasa lignocelulozică suferă mai întâi un pretratament fizico-chimic destinat preparării materialului pentru hidroliza enzimatică.

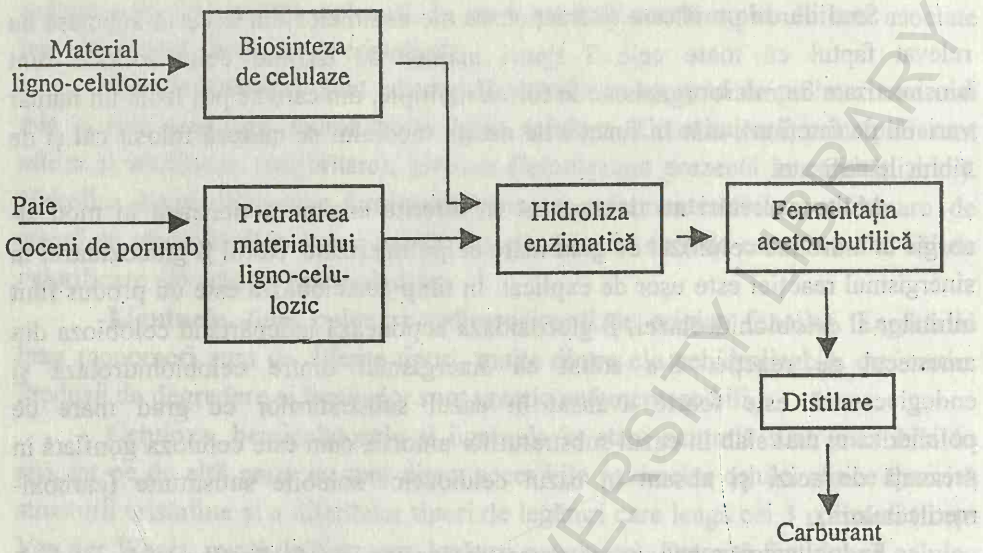


Fig. 13.1. Schema procedeului de producere de acetonă-butanol plecând de la biomasă lignocelulozică.

În acelaş timp, se realizează biosinteza de enzime celulozolitice prin fermentaţie, necesare tratamentului enzimatic. Preparatul enzimatic obţinut prin fermentaţie nu necesită nici concentrare nici purificare. După hidroliza enzimatică a materialului ligno-celulozic pretratat se separă reziduul nehidrolizat, iar zaharurile obţinute sunt transformate în solvenţi prin fermentaţie acetono-butilică. Aceşti solvenţi sunt apoi distilaţi, obţinându-se un amestec format din aproximativ 2/3 butanol, 1/3 acetonă şi urme de etanol.

13.2.2. Pretratări ale substratului lipo-celulozic

Ligninele sunt solubile la cald în medii alcaline, iar hemicelulozele sunt hidolizate în medii slab acide şi la cald. Din aceste proprietăţi rezultă principalele trei tipuri de pretratări studiate.

Pretratare alcalină. Condiţiile de mediu ale acestei pretratări sunt următoarele: peste substratul respectiv se adaugă 8–12% hidroxid de sodiu (procentele sunt exprimate în raport cu substanţa uscată a acestuia), apoi se menţine timp de 30–60 min la o temperatură între 80 şi 120°C. Această tehnică este asemănătoare celei folosite în industria hârtiei. În cursul pretratării o parte din lignine sunt solubilizate, la fel şi o parte din hemiceluloze, dar acestea suferă şi o degradare alcalină. Reziduul lichid rezultat în urma acestui tratament este identic

celui obținut în industria hârtiei și pune probleme severe de eliminare sau recuperare de reactivi, în timp ce reziduul solid trebuie spălat și neutralizat.

În aceste condiții materialul vegetal pretratat prezintă o excelentă susceptibilitate la hidroliza enzimatică, dată atât de atacul hemicelulozelor și ligninelor cât și de efectul de gonflare cu sodă a fibrelor celulozice, care le face mai accesibile apei și agenților hidrolizanți.

Pretratare acidă. Acest tip de pretratare este folosit mai ales în scopul valorificării celulozei pentru obținerea de etanol și se bazează pe diferența de rezistență la hidroliză acidă dintre hemiceluloze și celuloză. Pentru hidroliză se utilizează, în general, acid sulfuric în concentrații de 1–3%. Temperatura și durata tratamentului diferă în funcție de tehnologia utilizată: fie la 200°C timp de 10 s (reactor "plug-flow"), fie la 120...130°C, timp de 30 min (reactor cu percolare).

La sfârșitul tratamentului, efluentul lichid conține glucide (în special cu cinci atomi de carbon) provenite din hidroliza hemicelulozei. Reziduul solid conține partea celulozică și ligninele. Zaharurile sunt instabile în mediu acid, la cald, și se pot degrada în compuși aldehidici de tipul furfurolului. Acești produși de degradare inhibă fermentațiile și de aceea alegerea condițiilor experimentale este un compromis vizând o viteză de hidroliză a hemicelulozelor crescută, cu formare de produși toxici compatibili utilizării prin fermentație a glucidelor produse. Acest procedeu a fost studiat la scară pilot în Franța la Societatea Bertin, în S.U.A. de către Tennessee Valley Authority și în Noua Zeelandă de către Forest Research Institute.

Pretratarea cu vapori. În cursul pretratării prin hidroliză rapidă ("steam explosion"), fibra vegetală este adusă rapid la temparatură înaltă (180...240°C) prin injecție de vapori sub presiune.

Oprirea tratamentului se face prin decompresie explozivă. Trei fenomene pot fi puse în evidență în cursul acestei pretratări: o autohidroliză dată de eliberarea de grupări acetil substituite de numeroase zaharuri din structura hemicelulozelor; o fuziune a ligninelor urmată de recondensarea în picături după răcire, o destructurare intensă datorită eliberării explozive de produși care se traduce prin creștere importantă a suprafețelor accesibile. Aceste trei fenomene concură la ameliorarea hidrolizei enzimatice a fibrelor tratate. Acest tip de pretratare a fost promovat de sociatățile canadiene Iotech și Stacke și a fost studiat de numeroase firme și instituții: Forintek (Canada), ASCAF (Franța), Universitatea din Lund (Suedia).

Nici unul dintre cele trei tipuri de pretratări descrise anterior nu este total satisfăcător. Pretratările acide și alcaline sunt greu de pus în funcțiune, consumul de produși chimici pentru reacție și neutralizare este apreciabil, iar datorită gradului

mare de poluare se impune elaborarea de procedee de tratare şi recuperare a reactivilor. Pretratarea prin hidroliza rapidă (cu vapori) nu necesită aportul de produşi chimici şi în fermentaţiile acetono-butilice, însă eficacitatea este inferioară pretratării alcaline.

În prezent, se vizează combinarea avantajelor procedeului acid cu cele ale hidrolizei rapide. S-a constatat că dacă hidroliza cu vapori este efectuată pe un material ligno-celulozic acidifiat în prealabil, în anumite condiţii are loc o solubilizare totală şi o hidroliză a hemicelulozelor în monomerii lor, fără o degradare semnificativă cu formare de furfurol. Totodată, se observă o reacţie mai bună a celulozei la hidroliza enzimatică, existând astfel posibilitatea zaharificării complete a acestui polimer.

13.3. PRODUCŢIA DE ENZIME CELULOZOLITICE

Producţia şi caracterizarea enzimelor celulozolitice au făcut obiectul unui volum foarte important de cercetări fundamentale şi aplicative. Aceste cercetări mai întâi focalizate pe celulaze "sensu stricto" (hidroliza celulozei cristaline) au fost apoi direcţionate pe hemicelulaze, datorită interesului pentru potenţializarea acţiunii celulazelor pe material vegetal. Au fost identificate, clasificate şi secvenţializate genele principalelor enzime implicate, care au fost purificate şi multe dintre ele cristalizate. Structurile tridimensionale din ce în ce mai detaliate permit acum studierea şi modificarea principalelor regiuni funcţionale ale acestor molecule: situsul catalitic şi regiunile de absorţie. De asemenea, s-au dezvoltat sistemele de transformare omoloage şi heteroloage. Calitatea acestor rezultate experimentale duce la deschiderea unor perspective foarte generoase, atât în vederea ameliorării performanţelor catalitice ale enzimelor cât şi a eficienţei producţiei lor. Pe de altă parte, în prezent, costul de producţie a acestor sisteme enzimatice s-a redus semnificativ graţie creşterii spectaculoase a cantităţii de enzime celulozolitice produse pe unitatea de volum de fermentaţie.

Microorganisme utilizate. Majoritatea procedeelor studiate la scară preindustrială, sau aplicate la scară industrială, utilizează enzimele produse în fermentaţie submersă de către ciuperca *Trichoderma reesei*. Această ascomicetă are avantajul că excretă, în cantităţi mult mai mari decât alţi fungi şi alte bacterii, amestecul de enzime care permite hidroliza atât a celulozelor amorfe cât şi a celulozelor cristaline. Mutantele hiperproductive utilizate în prezent pot produce peste 40 g/l proteine solubile.

Medii de cultură. Sinteza de celulaze este supusă unei reglări complexe, dată de represia de către glucoză şi represorii catabolici uzuali şi inducerea biosintezei de către produşii de hidroliză ai celulozei. Din cauza acestor mecanisme de reglare, producţia de celulaze în fermentaţie submersă s-a efectuat mult timp în laboratoare, utilizând celuloza ca sursă unică de carbon şi energie. Calitatea celulozei era aleasă astfel încât hidroliza ei în cursul dezvoltării mucegaiului să fie suficient de lentă pentru a preîntâmpina acumularea de glucoză în timpul culturii. Era nevoie de celuloză purificată şi, deci, costisitoare. Pe de altă parte, concentraţia utilizată (50–70 g/l) producea o vâscozitate crescută a mediului de cultură. Datorită acestor motive de cost şi de vâscozitate, utilizarea acestui mediu de cultură nu a putut fi extrapolată la scară industrială. A fost, deci, necesară punerea la punct a unui mediu de cultură industrial bazat pe o sursă de carbon mai puţin scumpă şi cu o solubilitate redusă. Acest scop a fost atins prin utilizarea de tulpini mutante rezistente la represie catabolică.

S-a pus la punct un mediu de cultură în care lactoza este principala sursă de carbon şi energie. Alţi constituenţi ai mediului de cultură sunt sărurile minerale uzuale, necesarul de vitamine fiind acoperit prin adiţia a 1 kg/m^3 extract de drojdie sau extract de porumb ("corn steep liquer"). Eliminarea de celulaze în mediul de cultură este facilitată de prezenţa agenţilor tensio-activi în mediul de fermentaţie (un aport de maximum 100 g/m^3 –Tween 80).

Cinetica fermentaţiei. În figura 13.2 este redată cinetica creşterii şi biosintezei de celulaze de către o tulpină ameliorată genetic de *Trichoderma reesei* pe un mediu de cultură bazat pe 6 % lactoză şi 0,5 % pastă de hârtie. Această fermentaţie a fost efectuată într-un reactor de 3 m^3, cu agitare mecanică; turaţia agitatorului a fost de 120 rot/min, aeraţia de 0,5 l aer /l mediu/ minut, la o temperatură de 27°C în primele 40 ore, apoi la 25°C; *p*H-ul lăsat liber în primele 20 de ore a fost apoi reglat la *p*H = 5. Creşterea mucegaiului induce o acidifiere a mediului care este neutralizat prin adiţie de amoniac, care serveşte şi ca aport de azot mineral. Fermentaţia pentru biosinteza de celulaze este relativ lentă, durata întregii operaţii depăşind 140 de ore.

S-a utilizat tehnica alimentării continue cu lactoză. Această tehnică, menţinând un nivel minim al conţinutului în lactoză reziduală pe tot timpul fermentaţiei, permite o potenţializare maximă a sintezei enzimelor (tabelul 13.2).

În figura 13.3 este exemplificată cinetica creşterii microorganismului şi biosintezei de celulaze utilizând această tehnică numită "fed-batch". Se constată că la un timp de cultură echivalent cantităţile de proteine şi activităţile enzimatice sunt practic duble celor obţinute prin metoda "batch". Acest procedeu este în momentul de faţă operat la scară industrială (fermentator de 30 m^3).

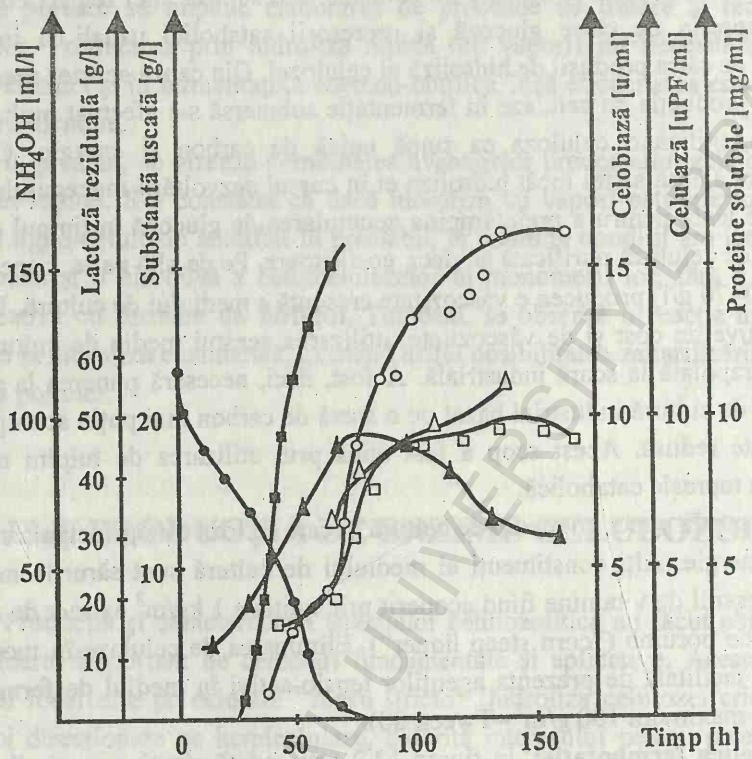


Fig. 13.2. Cinetica fermentației discontinue ("batch") de producere a celulazelor cu tulpini de *Trichoderma reesei* cultivată pe mediu cu lactoză, în reactor de $3m^3$ (Barnett C.,1991):

- ∘–∘ lactoză reziduală;
- ■–■ consumul de NH_4OH;
- ▲–▲ substanță uscată;
- o–o producția de proteine solubile;
- Δ –Δ producția de celulaze;
- □–□ producția de celobiază.

Tabelul 13.2

Ameliorarea succesivă a procedeului de producție a celulazelor[1]

Materii prime folosite	Celuloză	Lactoză	Lactoză
Tehnologia	batch	batch	fed batch
Activitate (uPF/ml)[2]	13,7	8,7	19,6
Proteine secretate (g/l)	17,9	14,7	13,1
Productivitate (uPF/l/h)	98	62	140
Preț de producție[3]	100	36	19

[1] Ansamblu de rezultate obținute cu tulpina ameliorată genetic CL-847.

[2] uPF = unități "paper filtre ".

[3] Exprimat în % față de prețul de producție al procedeului de referință: tehnologia celuloză batch.

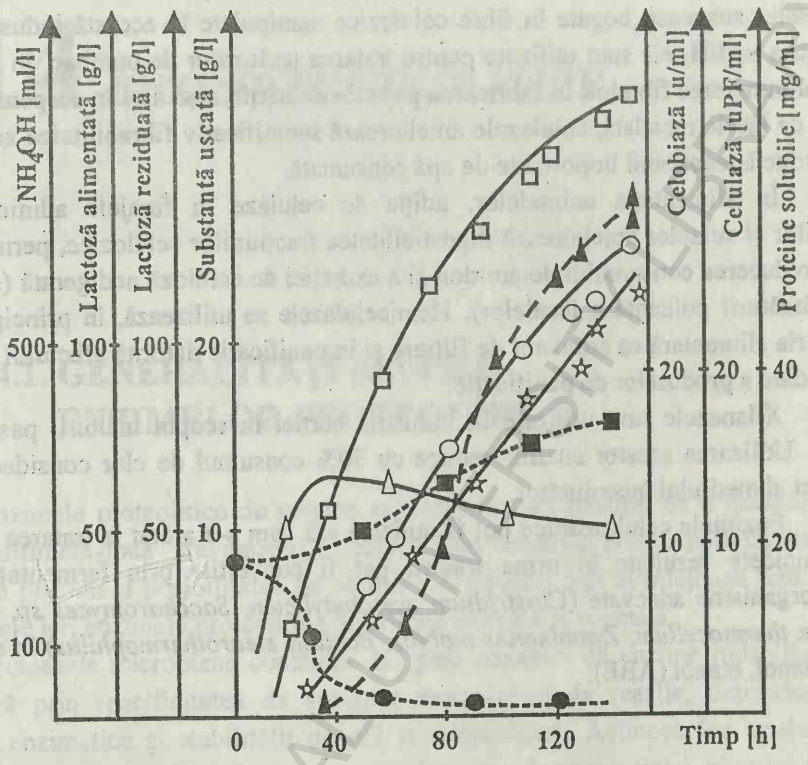


Fig.13.3. Cinetica fermentației discontinue (cu adaosuri) cu tulpini de *Tricoderma reesei* cultivată pe mediu cu lactoză:

- •–• lactoză reziduală;
- ■–■ lactoză alimentată;
- □–□ consumul de NH_4OH;
- Δ–Δ substanță uscată;
- *–* producția de proteine solubile;
- o–o producția de celulaze.
- ▲–▲ producția de celobiază;

13.4. APLICAȚII ALE CELULAZELOR ȘI HEMICELULAZELOR

Datorită prețului de producție scăzut, acestor enzime li se deschid perspective interesante pentru diferite aplicații industriale. Pe lângă utilizarea cvasiconfidențială a unor celulaze în formule medicamentoase utilizate pentru unele deficiențe ale tractului gastro-intestinal, există patru piețe principale pe care se comercializează producții semnificative de celulaze și hemicelulaze.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

În industria alimentară, celulazele sunt utilizate pentru a facilita filtrarea diverselor suspensii bogate în fibre celulozice manipulate în această industrie. În industria textilă, ele sunt utilizate pentru tratarea țesăturilor de bumbac, în special pentru înmuierea fibrelor. În fabricarea pastelor de hârtie, mai ales în suspensiile de pastă de hârtie reciclată, celulazele ameliorează semnificativ filtrabilitatea acestora şi conduc la economii importante de apă consumată.

În alimentația animalelor, adiția de celulaze în furajele administrate păsărilor şi suinelor ameliorează digestibilitatea fracțiunilor celulozice, permițând, deci, reducerea consumului de amidon şi a excreției de celuloză nedigerată (şi deci a încărcăturii poluante a fecalelor). Hemicelulazele se utilizează, în principal, în industria alimentară ca adjuvant de filtrare şi în panificație datorită efectului lor de expandare a produselor de panificație.

Xilanazele sunt utilizate în industria hârtiei în scopul înălbirii pastei de hârtie. Utilizarea acestor enzime reduce cu 30% consumul de clor considerat un poluant al mediului înconjurător.

Enzimele celulozolitice pot fi utilizate aşa cum s-a arătat la tratarea BLC, iar glucidele rezultate în urma tratării pot fi convertite prin fermentație cu microorganisme adecvate (*Clostridium acetobutylicum, Saccharomyces sp. Clostridium thermocellum, Zymomonas mobilis, Bacillus stearothermophilus*) în acetonă, butanol, etanol (ABE).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14 ENZIME PROTEOLITICE

14.1. GENERALITĂȚI ASUPRA ENZIMELOR PROTEOLITICE

Enzimele proteolitice de origine microbiană s-au bucurat de o deosebită atenție în ultimele două - trei decenii, cunoscut fiind domeniul larg de aplicabilitate al acestora precum și posibilitatea de obținere în condiții mai avantajoase față de concurentele lor, enzimele proteolitice de origine animală și vegetală.

Proteazele microbiene constituie un grup complex de enzime hidrolitice, care diferă prin specificitatea de substrat, mecanismul de reacție, dependența activității enzimatice și stabilității de *p*H și temperatură. Acțiunea lor poate fi blocată, activată, sau inhibată într-o anumită proporție de agenți fizici, chimici sau biologici. Producția și caracteristicile acestora pot fi influențate prin selecția sușei producătoare și alegerea condițiilor de cultivare ale acesteia.

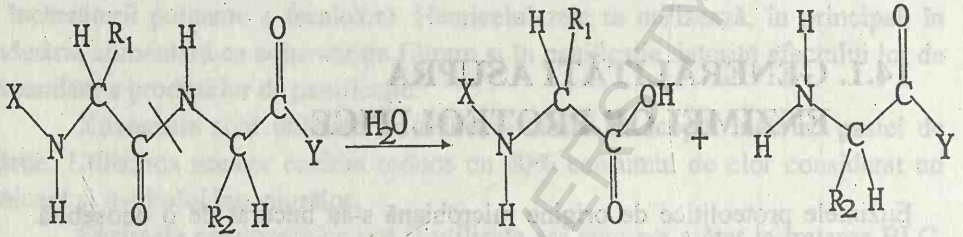
Enzimele din această categorie hidrolizează majoritatea proteinelor comune, cum ar fi: cazeina, hemoglobina, gelatina, albumina de ou, glutenul, proteina din soia și alte proteine vegetale și animale. Condițiile de hidroliză precum și randamentul operației în sine depind, însă, de natura, caracteristicile și gradul de puritate al preparatului enzimatic utilizat.

Numeroasele utilizări ale enzimelor proteolitice, în cele mai diferite domenii de activitate – industria alimentară, farmaceutică, agricultură, industria detergenților, medicină – au determinat demararea cercetărilor în vederea obținerii acestora pe cale biotehnologică, ținând seama în același timp de avantajele pe care le oferă utilizarea microorganismelor ca sursă biologică, precum și de proprietățile enzimelor microbiene.

BCU "VASILE GOLDIȘ" UNIVERSITY LIBRARY

14.2. ENZIME IMPLICATE ÎN DEGRADAREA PROTEINELOR

Peptidhidrolazele – proteinazele (sau proteazele) şi peptidazele – cunoscute şi sub denumirea generală de enzime proteolitice, au capacitatea de a cataliza scindarea hidrolitică a legăturilor –CO–NH– peptidice din proteine, polipeptide şi oligopeptide pînă la peptide de diferite mase moleculare sau chiar la aminoacizi, cu fixarea componentelor apei, după reacţia generală:



În funcţie de provienenţa lor, hidrolazele peptidice pot fi de origine vegetală, animală sau microbiană (produse de diferite bacterii, fungi, actinomycete). După locul în care îşi exercită acţiunea, proteazele pot fi intracelulare şi extracelulare.

În ultimele decenii, aprofundarea informaţiilor privind procesele şi diversificarea mijloacelor tehnice de cultivare a microorganismelor la nivel industrial, pentru obţinerea de aminoacizi, enzime, proteine, au determinat creşterea interesului pentru realizarea unor preparate enzimatice proteolitice din microorganisme în special din bacterii şi fungi. Interesul pentru astfel de preparate a crescut şi mai mult după anul 1965, când pentru obţinerea de detergenţi cu enzime, de tip "Biotex", s-au utilizat proteaze produse de *Bacillus licheniformis*.

Multe dintre microorganismele folosite la producerea de preparate proteolitice produc aceste enzime extracelular, ceea ce uşurează foarte mult condiţiile de prelucrare industrială pentru obţinerea de preparate enzimatice. Datorită acestui fapt, există în prezent tendinţa ca o serie de preparate proteolitice de natură vegetală sau animală să fie înlocuite cu preparate proteolitice microbiene care sunt, în general, mai ieftine şi de o mai mare diversitate.

14.2.1. Clasificarea enzimelor proteolitice

Proteazele sunt hidrolaze care, conform clasificării internaţionale, Comisia de Enzimologie – International Union of Biochemistry – I.U.B. –, fac parte din subclasa 4, fiind cuprinse în subsubclasele E.C.3.4.21 – E.C.3.4.24.

Alături de proteaze în această subclasă sunt clasificate şi peptidazele cuprinse în subsubclasele având codurile E.C.3.4.11 – E.C.3.4.17. În figura 14.1 se prezintă schema clasificării hidrolazelor peptidice.

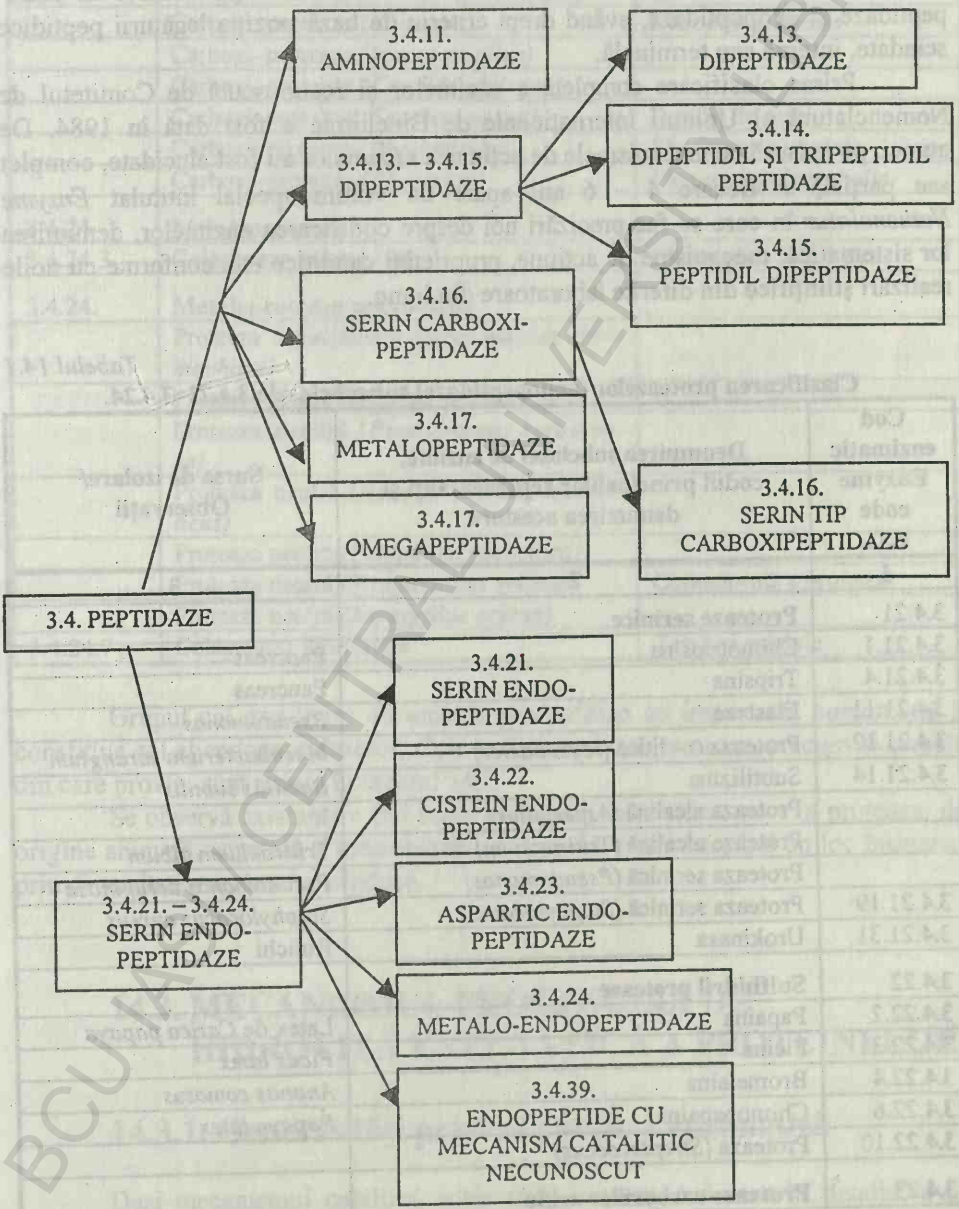


Fig. 14.1. Schema clasificării hidrolazelor peptidice.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITAR

Prima clasificare a enzimelor proteolitice aparţine lui E. Abderhalden (1914), care le împarte în funcţie de mărimea moleculei substratului în peptidaze ce degradează polipeptidele şi proteinaze (proteaze) care acţionează asupra proteinelor.

Mai târziu, Bergman (1942) a clasificat enzimele proteolitice în endopeptidaze şi exopeptidaze, având drept criteriu de bază poziţia legăturii peptidice scindate, internă sau terminală.

Prima clasificare completă a enzimelor şi recunoscută de Comitetul de Nomenclatură al Uniunii Internaţionale de Biochimie a fost dată în 1984. De atunci, pe măsură ce mecanismele de acţiune a enzimelor au fost elucidate, complet sau parţial, la fiecare 4 – 6 ani apare un volum special intitulat *Enzyme Nomenclatur* în care se fac precizări noi despre codificarea enzimelor, denumirea lor sistematică, mecanisme de acţiune, proprietăţi catalitice etc. conforme cu noile realizări ştiinţifice din diferite laboratoare din lume.

Tabelul 14.1

Clasificarea proteazelor (endopeptidaze) subsubclasele 3.4.21–3.4.24.

Cod enzimatic Enzyme code E.C.	Denumirea subclasei de enzime, codul principalilor reprezentanţi şi denumirea acestora	Sursa de izolare/ Observaţii
1	2	3
3.4.21	**Proteaze serinice**	
3.4.21.1	Chimotripsina	Pancreas
3.4.21.4	Tripsina	Pancreas
3.4.21.11	Elastaza	*Pseudomonas*
3.4.21.12	Proteaza α - litică *(Myxobacter)*	*Mycobacterium sorangium*
3.4.21.14	Subtilizina	*Bacillus subtilis*
	Proteaza alcalină *(Aspergillus)*	
	Proteaza alcalină *(Tritirachium)*	*Tritirachium album*
	Proteaza serinică *(Pseudomonas)*	*Pseudomonas aeruginosa*
3.4.21.19	Proteaza serinică *(Staphylococus)*	*Staphylococus aureus*
3.4.21.31	Urokinaza	Rinichi
3.4.22	**Sulfhidril proteaze**	
3.4.22.2	Papaina	Latex de *Carica papaya*
3.4.22.3	Ficina	*Ficus latex*
3.4.22.4	Bromelaina	*Ananas comosus*
3.4.22.6	Chimopapaina	*Papaya latex*
3.4.22.10	Proteaza *(Streptococcus)*	
3.4.23	**Proteaze carboxilice acide**	
3.4.23.1	Pepsina A	Sucul gastric
3.4.23.2	Pepsina B	Sucul gastric
3.4.23.3	Pepsina C	Sucul gastric

Tabelul 14.1 (continuare)

1	2	3
3.4.23.6	**Proteaze carboxilice microbiene**	
	Proteaza carboxilică *(Aspergillus oryzae)*	
	Proteaza carboxilică *(Aspergillus saitoi)*	
	Proteaza carboxilică *(Aspergillus niger)*	
	Carboxi–proteaza *(Rhizopus)*	*Rhizopus chinensis*
	Carboxi–proteaza *(Mucor pusillus)*	
	Carboxi–proteaza *(Candida albicans)*	
	Carboxi–proteaza *(Saccharomyces)*	Drojdie de bere
	Carboxi–proteaza *(Rhodotorula)*	*Rhodotorula glutinis*
	Carboxi–proteaza *(Physarum)*	*Physarum polycephalin*
3.4.24	**Metaloproteaze**	
3.4.24.3	Colagenaza microbiană	*Clostridium histolyticus*
3.4.24.	**Metaloproteaze microbiene**	
	Proteaza intracelulară *(Streptomyces thermophilus)*	
	Proteaza neutră *(Bacillus subtilis)*	
	Proteaza alcalină *(Pseudomonas aeruginosa)*	
	Proteaza neutră *(Bacillus thermoproteolyticus)*	
	Proteaza neutră *(Penicilium roqueforti)*	
	Proteaza neutră *(Streptomyces griseus)*	Componentă a pronazei
	Proteaza neutră *(Aspergillus oryzae)*	
3.4.24.7	Colagenaza intestinală	Țesuturi animale

Grupul cel mai mare de enzime proteolitice cu importanță comercială îl constituie cel al endopeptidazelor. Cele mai importante proteaze, precum și sursele din care provin, sunt redate în tabelul 14.1.

Se observă existența a trei surse biologice cu conținut mare în proteaze: de origine animală, vegetală și microbiană, acestea din urmă ocupând un loc însemnat prin diversitatea enzimelor produse.

14.3. MECANISMUL PROCESULUI DE HIDROLIZĂ ENZIMATICĂ A PROTEINELOR

14.3.1. Generalități privind cataliza enzimatică

Deși mecanismul catalizei enzimatice nu este cunoscut în detaliu, s-au făcut mari progrese în această direcție prin studii cinetice și de specificitate, prin analiza chimică a situsurilor active ale enzimelor și prin comparație cu ajutorul

difracției de raze X, a structurii unor enzime și a complecșilor lor cu substraturi mici sau inhibitori competitivi. Datele obținute au permis elaborarea unor teorii privind mecanismul de acțiune al enzimelor a căror verificare în practică a fost dovedită, drumul rămânând deschis.

În general, cataliza enzimatică presupune existența a trei etape, care sunt prezentate în cele ce urmează.

Aproprierea și orientarea substratului. Substratul se aproprie de situsul catalitic în așa fel încât legătura sa susceptibilă să fie în imediata vecinătate a centrului catalitic activ al enzimei și se orientează față de acesta astfel încât starea de tranziție să fie formată ușor. Enzima acționează prin încercarea de legare a substratului la centrul catalitic activ; astfel, în zona situsului se creează o concentrație de substrat de cca 10 ori mai mare decât în restul soluției și astfel viteza crește cu acest ordin de mărime.

T.C. Bruice și colaboratorii săi au arătat că aproprierea centrului catalitic activ de legătura susceptibilă a substratului este o reacție favorizată de asistența anchimerică. Pe de altă parte, D.R.Storm și D.E.Koshland Jr. au dezvoltat o teorie, postulând că funcția majoră a situsului activ al enzimei este inducerea orientării orbitalilor și anume: orbitalii substratului și ai centrului catalitic se orientează într-o dispunere specifică, astfel încât complexul enzimă–substrat să treacă mai ușor în starea de tranziție. S-au emis 3 ipoteze:

- *ipoteza orientării orbitalilor*;
- *ipoteza complementarității de tip lacăt – cheie*;
- *ipoteza adaptării induse*, ultima aparținând lui Koshland, care pare cea mai apropiată de realitate.

Koshland a ajuns la concluzia că grupările funcționale ale situsului activ al enzimei nu se află în poziție optimă pentru cataliză, atunci când acesta este liber; moleculele de substrat impun acestora o conformație în care grupările catalitice au o poziție geometrică favorabilă formării stării de tranziție. Este ceea ce se numește o *adaptare indusă*. Moleculele de enzimă sunt instabile în forma activă și, în absența substratului, tind să revină la forma liberă.

Formarea stării de tranziție. Unele enzime se pot combina cu substratul, formând un intermediar covalent instabil, care se transformă repede în produși de reacție. În acest caz are loc o cataliză covalentă. Având grupări funcționale capabile să doneze sau să accepte protoni, enzima poate determina o cataliză general - acidă sau bazică.

În cazul proteazelor, cercetările efectuate în scopul elucidării mecanismului catalizei enzimatice, s-a demonstrat formarea unui intermediar covalent foarte reactiv, care are o mai mare posibilitate de a atinge starea de tranziție, permițând astfel substratului să învingă bariera energiei de activare. Aceste enzime sunt clasificate în funcție de aminoacidul cu care reacționează substratul –

subclasele serinei, cisteinei, histidinei, lizinei. În subclasa serinei, gruparea hidroxil a restului de serină participă la formarea unui ester intermediar, fie cu o grupare acil, ca în cazul chimotripsinei, formând o acil-enzimă, fie cu o grupare fosforică, ca la fosfoglucomutază, pentru a forma o fosfoenzimă. Menționăm că în această subclasă sunt incluse serin-protează le al căror mecanism de reacție și structură vor fi descrise în continuare.

Cataliza covalentă implică atacul unei grupări nucleofile a enzimei asupra atomului de carbon electrofil al substratului:

$$RX + Y^- \xrightarrow{\text{rapid}} RY + X^- \qquad Y^- - \text{nucleofil}$$

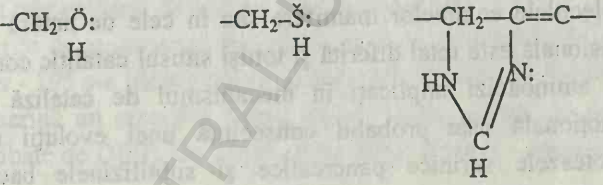
$$RY + H_2O \xrightarrow{\text{rapid}} ROH + Y^- + H^+$$

$$RX + H_2O \xrightarrow{\text{rapid}} ROH + X^- + H^+$$

Reacție fără catalizator:

$$RX + H_2O \xrightarrow{\text{lent}} ROX + X^- + H^+$$

Grupările nucleofile din enzimă au, în general, următoarele forme:



Pentru a avea loc cataliza nucleofilă este necesar ca substratul să reacționeze mai rapid cu catalizatorul nucleofil decât ar reacționa cu gruparea acil acceptoare finală; catalizatorul acilat astfel format trebuie, de asemenea, să reacționeze mai repede cu acceptorul acil final decât cu substratul inițial; astfel formarea intermediarului covalent poate coborî bariera energiei de activare a reacției prin implicarea transferului grupării acil.

Enzimele pot induce tensiuni și distorsiuni în legătura atacată a moleculei de substrat, făcând-o mai ușor degradabilă. Măsurătorile de rotație și cele efectuate prin metoda difracției cu raze X au demonstrat că enzimele suferă schimbări de conformație în cursul actului catalitic. Richard și colaboratorii săi au demonstrat că lanțul polipeptidic al enzimelor este astfel pliat încât resturile de aminoacizi care formează situsul catalitic activ sunt aduse într-o poziție foarte apropiată.

Există mai multe ipoteze referitoare la diferențele de conformație între enzima liberă și forma ei combinată cu substratul. Una dintre acestea susține că

situsul catalitic activ al enzimei libere nu se potriveşte exact nici cu substratul, nici cu produşii lui, ci doar cu speciile caracteristice stării de tranziţie. Inducţia deformează atât enzima cât şi substratul, făcându-le să atingă starea de tranziţie mult mai repede. S-a ajuns la concluzia că toţi trei factorii expuşi anterior contribuie la cataliza enzimatică.

Studiile de structură şi mecanism de acţiune al enzimelor proteolitice au demonstrat că acestea urmează aceleaşi etape în acţiunea lor de hidroliză enzimatică a proteinelor, indiferent de complexitatea structurală a proteinelor hidrolizate.

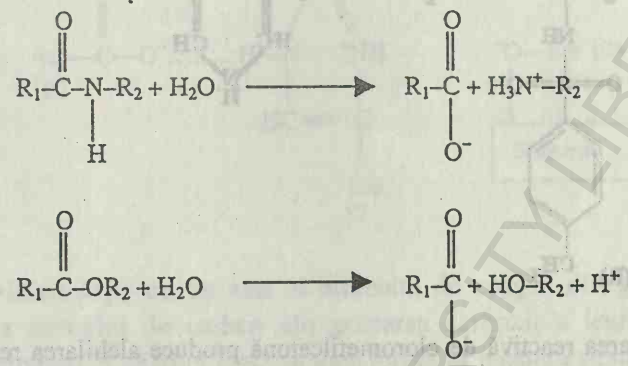
14.3.2. Mecanismul de acţiune al proteazelor

Studiile efectuate pe câteva sute de enzime proteolitice au relevat numai 4 mari tipuri de mecanisme catalitice, cele implicând serin-proteazele fiind predominante. Aceste studii de structură şi mecanism de reacţie au demonstrat că în cazul serin–enzimelor, indiferent de provenienţa acestora (animală sau microbiană), mecanismul catalitic este acelaşi, cu toate că resturile de aminoacizi care intră în structura situsului catalitic ocupă poziţii diferite în secvenţa de aminoacizi în moleculele enzimelor mamifere sau în cele de natură microbiană. Structura tridimensională este total diferită şi totuşi situsul catalitic conţine acelaşi număr şi aceiaşi aminoacizi implicaţi în mecanismul de cataliză enzimatică. Similitudinea funcţională este probabil consecinţa unei evoluţii convergente independente. Proteazele serinice pancreatice şi subtilizinele bacteriene, de exemplu, au ajuns la acelaşi mecanism de hidroliză, dar independent, pentru că există un număr limitat de căi eficiente în mecanismul de scindare al legăturilor peptidice.

Diferitele moduri de evoluţie a procesului pot fi puse în evidenţă comparând structura şi modul de acţiune al chimotripsinei, enzimă pancreatică, cu cel al subtilizinei, enzimă bacteriană. Chimotripsina conţine 5 legături disulfurice, în timp ce subtilizina conţine 9. Secvenţa aminoacizilor în jurul situsului catalitic activ este foarte diferită, structura tridimensională este total diferită, însă situsul catalitic al subtilizinei conţine o triadă catalitică asemănătoare cu a chimotripsinei. De aceea, mecanismul de reacţie al serin-proteazelor este, în general, ilustrat în totalitate de modul de acţiune al chimotripsinei.

Chimotripsina este o endopeptidază având o specificitate de substrat de reacţie şi de grup. Astfel, este selectivă pentru legăturile peptidice de la capătul carboxilic al moleculei, atacând pe cele la care participă resturile de tirosină,

triptofan, fenilalanină şi metionină. Ea hidrolizează, de asemenea, legăturile ester. De aceea, mecanismul chimotripsinei poate fi studiat prin hidroliza esterilor simpli:

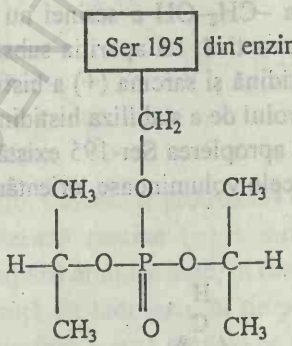


Cu ajutorul difracţiei de raze X s-a studiat şi s-a dovedit că structura conformaţională a chimotripsinei permite formarea triadei:

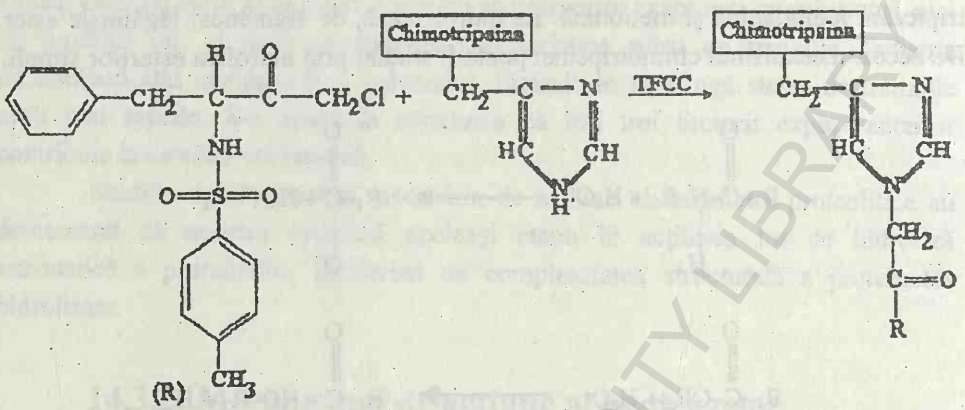
Asp – His – Ser
(102) (57) (195)

cu rol cheie în mecanismul de reacţie al chimotripsinei.

Resturile de aminoacizi din situsul activ au fost identificate prin metodele cunoscute: Ser - 195 s-a identificat cu diizopropilfluorofosfat (DIFP) care formează cu restul de serină un complex foarte stabil. Toate proteazele aparţinând acestei clase sunt inhibate de DIFP. De aceea ele se numesc serin - proteaze:



Rolul catalitic al His - 57 a fost demonstrat prin marcare fină cu tosyl-L-fenilalanincloromethilcetonă (TFCC):



Gruparea reactivă de clorometilcetonă produce alchilarea restului His-57, conducând la un compus complet inactiv, care poate fi izolat printr-o hidroliză exhaustivă a tuturor legăturilor peptidice ale enzimei. Trei considerente indică faptul că His-57 face parte din situsul catalitic activ:

– reacţia este stereospecifică, întrucât izomerul D al TFCC este total ineficace;

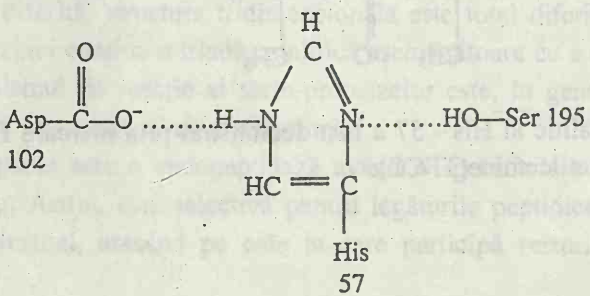
– reacţia este inhibată competitiv de β-fenilpropionat, care este cunoscut ca un inhibitor al chimotripsinei;

– viteza de inactivare cu TFCC variază cu *p*H-ul în acelaşi mod ca şi reacţia necatalizată.

Mecanismul reacţiei enzimatice catalizate de chimotripsină demarează, aşa cum s-a arătat anterior, prin aproprierea şi orientarea enzimei faţă de substrat.

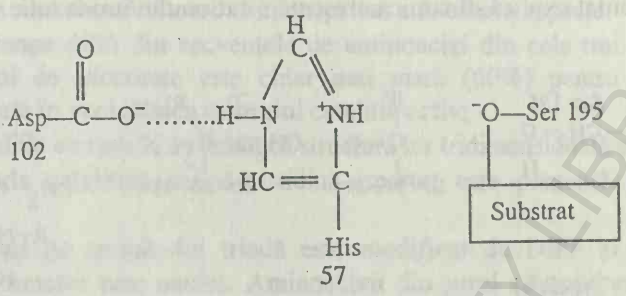
În mod obişnuit, gruparea $-CH_2-OH$ a serinei nu este foarte reactivă şi totuşi în chimotripsină ea devine reactivă. La apariţia substratului, protonul de la hidroxilul serinei se prinde de histidină şi sarcina (+) a histidinei este contracarată de restul de aspartat care are doar rolul de a stabiliza histidina în starea de tranziţie. Studiile cu raze X au stabilit că în apropierea Ser-195 există un "buzunar" nepolar în care intră resturile aromatice şi cele voluminoase, orientându-se spre legătura cu Ser-195. Mecanismul de atac este:

– fără substrat:

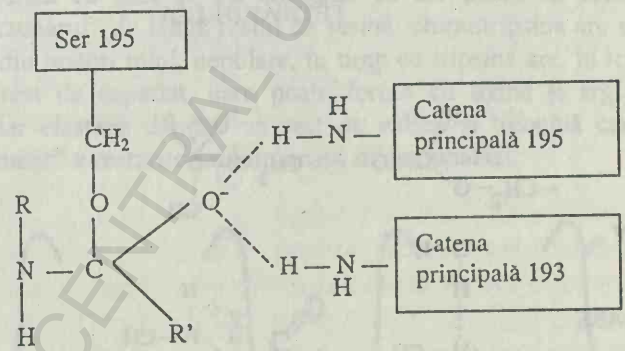


BCU IAŞI - BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

– cu substrat:



Hidroliza începe cu un atac al atomului de oxigen din gruparea OH a serinei asupra atomului de carbon din gruparea carboxil a legăturii peptidice atacate a substratului. Legătura C=O se transformă în legătură simplă cu oxigenul încărcat negativ C–O⁻. Al patrulea atom care se va lega de carbon se va aranja în tetraedru. Formarea intermediarului tetraedric dintr-o grupare de amidă plană este posibilă datorită legăturii de hidrogen formate între sarcina negativă a oxigenului (numit oxyanion) şi două grupări N–H din catenele principale ale enzimei:



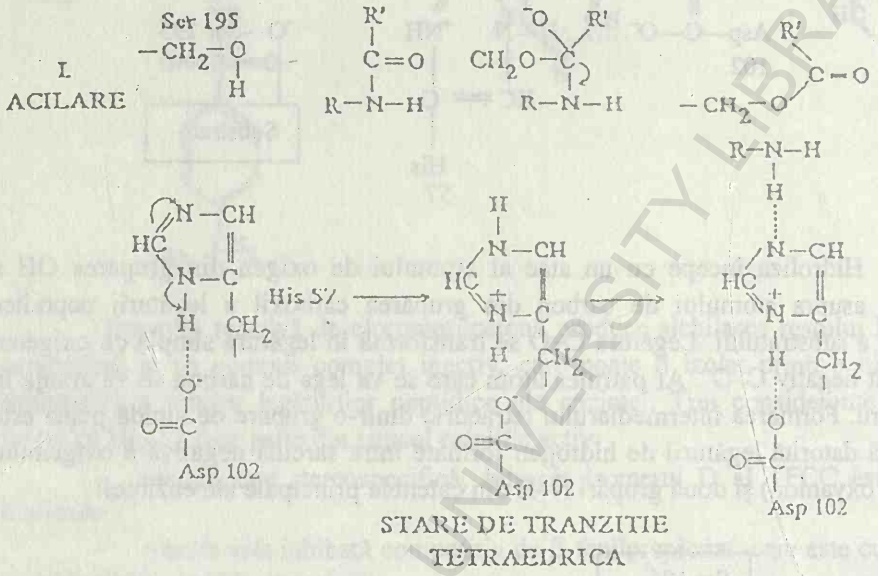
În primul stadiu, transferul protonului de la serină la histidină este uşurat de Asp⁻ care neutralizează sarcina (+) a inelului histidinic. Protonul legat de histidină este donat grupării aminice care, în timpul stării de tranziţie, este legată de histidină printr-o legătură de hidrogen, în timp ce componenta *acil* este legată de substrat; din acest motiv faza poartă numele de *fază de acilare*.

În al doilea stadiu, deacilarea, o moleculă de apă ocupă locul aminei. Protonul provenit de la H_2O se leagă de histidină iar $(HO)^-$ format atacă atomul C din legătura ester – enzimă, formându-se din nou intermediarul tetraedric (fig. 14.2).

Recent s-au efectuat studii privind stabilitatea intermediarului tetraedric prin alchilarea chimotripsinei şi tripsinei cu tosilfenilalanilclormetan marcat 1-C^{13} şi 2-C^{13} şi obţinerea de produşi de inhibiţie a căror cinetică a putut fi studiată. S-a

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pus astfel în evidență caracterul nucleofil deschis al grupării OH din Ser-195, iar modelul prezentat explică dinamica crescută a cationului imidazolic.



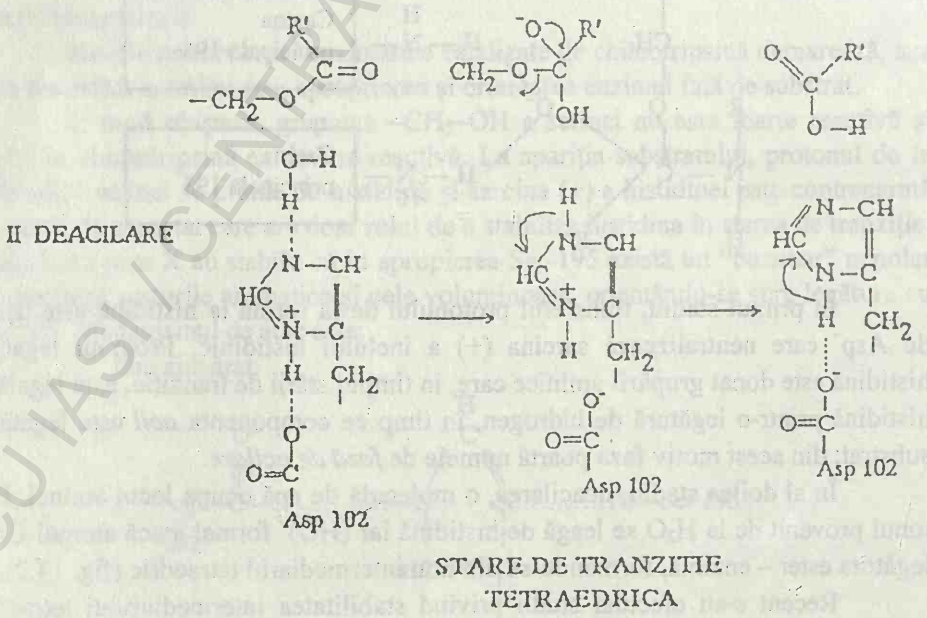


Fig. 14.2. Mecanismul de acțiune al serin-proteazelor.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tripsina şi elastaza sunt alte două enzime digestive din clasa serin-proteazelor. Ele sunt asemănătoare chimotripsinei sub câteva aspecte:

– aproape 40% din secvenţele de aminoacizi din cele trei enzime sunt identice. Gradul de identitate este chiar mai mare (60%) pentru resturile de aminoacizi situate în vecinătatea centrului catalitic activ;

– studiile cu raze X au arătat că structura lor tridimensională este similară;

– triada catalitică serină-histidină-aspartat este prezentă şi în aceste serin-proteaze;

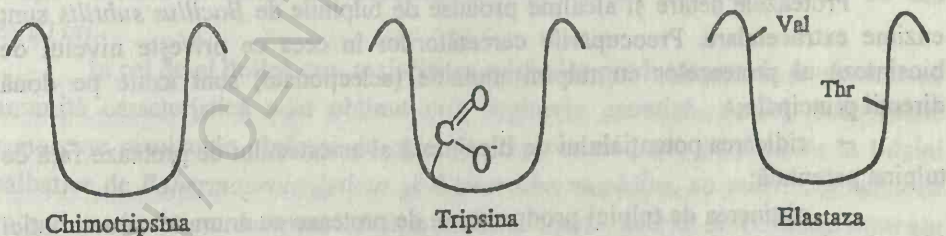
– restul de serină din triadă este modificat de DIPF şi procesul de hidroliză a proteinelor eate anulat. Aminoacizii din jurul situsului catalitic activ sunt aceiaşi;

– toate trei enzimele au un mecanism catalitic identic. Triada catalitică şi oxanionul din fiecare enzimă conduc la formarea stării de tranziţie tetraedrică;

– aceste enzime sunt secretate de pancreas ca precursori inactivi şi se activează prin scindarea unei singure legături peptidice.

Cele trei enzime diferă doar prin specificitatea lor de substrat. Astfel, chimotripsina hidrolizează resturile aromatice şi voluminoase, tripsina hidrolizează resturile de lizină şi arginină, elastaza hidrolizează resturi puţin voluminoase ale unor aminoacizi monoaminocarbocilici, care nu pot disocia.

Din analiza cu raze X s-a constatat că ele diferă în ceea ce priveşte aşezarea în "buzunarul" de lângă restul de serină: chimotripsina are un "buzunar" alcătuit numai din resturi mici, nepolare, în timp ce tripsina are, în locul unui rest de serină, un rest de aspartat, care poate forma cu lizina şi arginina legături electrostatice, iar elastaza conţine un rest de valină şi treonină care nu permit intrarea în "buzunar" a resturilor voluminoase de aminoacizi.



14.4. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE ENZIME PROTEOLITICE

Microorganismele producătoare de proteaze fac parte din diverse grupe sistematice: bacterii, fungi, actinomicete.

Dintre **bacteriile** cel mai des citate în literatura de specialitate ca bune producătoare de enzime proteolitice amintim:

- *Bacillus subtilis*;
- *Bacillus pumillus*;
- *Bacillus amylosaccharitic*us;
- *Bacillus amyloliquefaciens*;
- *Bacillus stearothermophylus*;
- *Bacillus thermoproteolyticus*;
- *Bacillus licheniformis*.

Dintre **fungii** producători de proteaze menționăm:

- *Aspergillus sojae*;
- *Aspergillus flavus*;
- *Aspergillus niger*;
- *Aspergillus oryzae*;
- *Rhyzopus oryzae*.

Printre **actinomycete**, producători mai importanți de proteaze sunt:

- *Streptomyces lichefaciens*;
- *Streptomyces griseus*.

Microorganismele aparținând speciilor *Bacillus subtilis* și *Aspergillus oryzae* sunt cele mai utilizate în producția de proteaze, existând un volum mare de informații în acest domeniu. Este necesar să menționăm că activitatea de biosinteză a proteazelor este scăzută la tulpinile izolate din surse naturale, de aceea în majoritatea cazurilor sunt utilizate tulpini selecționate, tehnicile de selecție constituind un domeniu specific și important al geneticii microorganismelor.

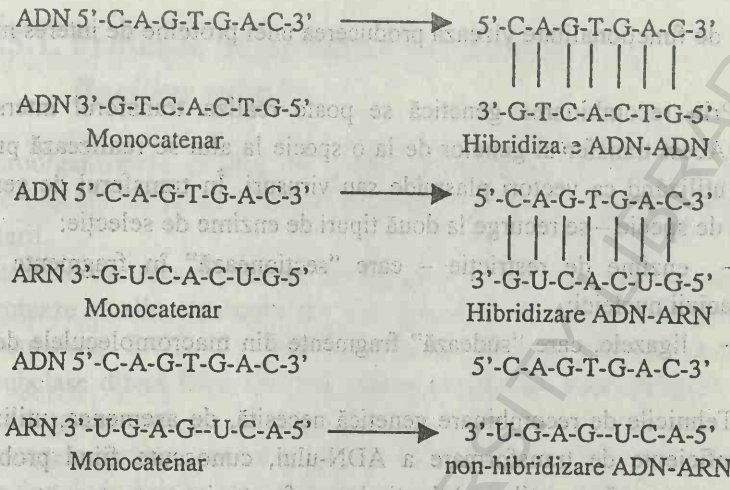
În general, atât producătorii naturali, cât și tulpinile selecționate produc un amestec de enzime proteolitice, care diferă între ele atât în ceea ce privește *p*H-ul optim (acid, neutru, alcalin), cât și prin specificitatea lor de acțiune. Din acest motiv, pentru fiecare microorganism în parte se specifică tipul de proteaze produs cu preponderență. Astfel, microorganismele aparținând speciei *Bacillus subtilis* sunt cunoscute ca producătoare de proteaze neutre și alcaline, iar microorganismele aparținând speciei *Aspergillus oryzae* sunt producătoare de proteaze acide, neutre și alcaline.

Proteazele neutre și alcaline produse de tulpinile de *Bacillus subtilis* sunt enzime extracelulare. Preocupările cercetătorilor în ceea ce privește nivelul de biosinteză al proteazelor cu tulpini mutante (selecționate) sunt axate pe două direcții principale:

- ridicarea potențialului de biosinteză al amestecului de proteaze față de tulpina parentală;
- obținerea de tulpini producătoare de proteaze cu anumite caracteristici (de exemplu, active în domeniul de *p*H alcalin sau proteaze termostabile).

În primul caz, o modalitate pentru obținerea de tulpini în cantități apreciabile și cu activitate enzimatică mare care biosintetizează enzime este inducerea de mutanți (selecție inductivă) și obținerea de variante active prin diferite metode (adaptarea, hibridizarea, transducția etc.).

Procedura de hibridizare rezidă în "legarea" a două fragmente monocatenare de acizi nucleici și constituirea unei structuri dicatenare stabile. Pentru realizarea hibridizării este necesară existența omologiei, caracterizată prin complementaritatea secvențelor de nucleotide. Hibridizarea se produce între monocatene identice (ADN–ADN) sau diferite (ADN–ARN).



Omologia dovedeşte fie existenţa unei provenienţe comune a catenelor (ADN dicatenar iniţial), fie existenţa unei "interrelaţii de matriţă" în cadrul sintezei cu încorporarea deoxiribonucleotidelor (prin replicare sau retrotranscripţie).

În scopul sesizării fragmentelor hibridizate se face marcarea uneia din catene prin legarea nucleotidelor marcate cu ^{32}P sau ^{3}H în prezenţa timidinkinazei (similar procedeului de secvenţializare).

Conform datelor din literatura de specialitate, mutagenii cei mai eficienţi sunt: nitrozoetiluree, nitrozometiluree, nitrozoguanidina, dietilsulfatul, precum şi agenţi fizici (radiaţii X, radiaţii γ, neutroni rapizi). Astfel, prin mutageneză s-a reuşit ridicarea nivelului de biosinteză a tulpinilor de *Bacillus subtilis* de cca 8–10 ori.

În cel de-al doilea caz, majoritatea tulpinilor producătoare de proteaze cu o anumită caracteristică s-au obţinut prin inginerie genetică. Astfel, sunt foarte cunoscute rezultatele obţinute de cercetătorii japonezi care, pornind de la tulpini sălbatice de *B.thermoproteolyticus* şi *B.stearothermophilus*, au reuşit obţinerea de tulpini producătoare de termolizină, o protează foarte diferită de celelalte proteaze neutre atât în ceea ce priveşte termostabilitatea cât şi mecanismul de acţiune.

În prezent, cunoscând structura termolizinei precum şi gena răspunzătoare de caracteristicile deosebite ale acestei proteaze, foarte mulţi cercetători încearcă obţinerea de tulpini de *B.subtilis*, *B.stearothermophilus*, producătoare de proteaze asemănătoare acesteia, utilizând tehnica clonării sau tehnica mutagenezei *in situ*.

În biologia moleculară se utilizează curent metode prin care se urmăreşte clonarea de gene şi recombinarea genetică. Aceste metode sunt destinate izolării unei anumite gene, bine definită în ansamblul genomului. După izolare, se urmăreşte purificarea, amplificarea şi, eventual, funcţionalitatea acestei gene.

Aspectul de funcţionalitate vizează producerea unei proteine de interes medical sau biologic.

Prin recombinarea genetică se poate realiza transferul interspecific al genelor. Acest transfer al genelor de la o specie la alta se realizează prin metode speciale utilizând ca vectori plasmide sau virusuri. În transferul de gene – peste barierele de specie – se recurge la două tipuri de enzime de selecţie:

– enzime de restricţie – care "secţionează" în fragmente macromoleculare acizii nucleici;

– ligazele, care "sudează" fragmente din macromoleculele de acizi nucleici.

Tehnicile de recombinare genetică necesită, de asemenea, utilizarea unor metode eficiente de transformare a ADN-ului, cunoscute fiind problemele de stabilitate a transformanţilor obţinuţi, lucru foarte important pentru un proces biotehnologic. Aplicarea tehnicilor de transformare de protoplaşti, electroporare, transducţie, conjugare au condus în unele cazuri la rezultate spectaculoase. De exemplu, în cazul biosintezei enzimelor proteolitice s-au obţinut microorganisme cu potenţial crescut de circa 4–5 ori în producerea lor.

14.5. STRUCTURA ŞI PROPRIETĂŢILE ENZIMELOR PROTEOLITICE MICROBIENE

Literatura de specialitate recentă referitoare la structura proteazelor microbiene demonstrează importanţa acestor cercetări în ingineria genetică, a cărei dezvoltare pune la îndemâna cercetătorilor tehnici şi metode de obţinere a unor enzime cu însuşiri speciale. De exemplu, cunoaşterea structurii enzimelor proteolitice produse de *Bacillus stearothermophilus* prin detectarea exactă a secvenţei de aminoacizi răspunzătoare de termostabilitatea acestor enzime, înţelegerea fenomenului şi efectuarea de modificări în structura enzimei prin metoda mutagenezei directe *in situ*, astfel încât această proprietate deosebit de importantă pentru protează să poată fi îmbunătăţită. De exemplu, mărirea termostabilităţii s-a efectuat prin înlocuirea Ala^{170} cu un rest de serină. Simularea dinamică a moleculei a arătat că $serina^{170}$ stabilizează enzima prin formarea unei legături de hidrogen cu restul unui alt aminoacid. Prin apariţia grupării hidroxil din Ser^{170}, enzima devine mai stabilă prin "umplerea" unei "cavităţi interne".

14.5.1. Proteaze bacteriene biosintetizate de *Bacillus subtilis*

Microorganismele produc în general amestecuri de proteaze a căror caracterizare biochimică poate fi efectuată după separare şi testare în funcţie de anumite criterii.

Proteazele bacteriene produse de tulpinile de *Bacillus subtilis* sunt amestecuri de proteaze alcaline (subsubclasa E.C.3.4.21 Proteaze serinice) şi proteaze neutre (subsubclasa E.C.3.4.24 Metaloproteaze). Aceste proteaze aparţinând diferitelor subclase diferă între ele prin câteva proprietăţi distincte după cum se prezintă în cele ce urmează.

Proteazele serinice. Aceste proteaze au în centrul activ serina şi histidina. Acest grup a fost divizat de Morihara în alte 4 subgrupe:

- proteaze similare tripsinei;
- proteaze alcaline;
- proteaze *Myxobacter* α-litice;
- proteaze stafilococice.

Proteazele similare tripsinei cuprind, în afară de tripsină şi chimotripsină, enzime biosintetizate de specii de *Streptomyces*, care hidrolizează legăturile $Arg^{22} - Gly^{23}$ şi $Lys^{29} - Ala^{30}$ din lanţul B-insulinic, această specificitate de substrat fiind trăsătura distinctivă. Aceste enzime acţionează la *p*H = 8,0, au temperatura optimă de cataliză 50°C, sunt inhibate de diizopropilfluorfosfat (DIFP), *p*-cloromercurilbenzoat (PCMB), tosil-L-lizin-clorometilcetonă (TLCK) şi de inhibitorul tripsinei izolat din soia. Activitatea lor nu este influenţată de etilendiaminotetraacetat (EDTA) şi de acidul iod-acetic (IAA). Enzimele prezintă şi activitate esterazică şi amidazică.

Proteazele alcaline, a doua grupă de proteaze serinice, sunt biosintetizate de bacterii, drojdii şi fungi, fiind prezente şi în ţesuturile animale. În această grupă se încadrează şi proteazele alcaline produse de unele tulpini de *Bacillus subtilis* şi cele fungice din *Aspergillus oryzae*. Aceste proteaze au acţiune specifică faţă de resturile de aminoacizi aromatici sau hidrofobi care participă cu gruparea carboxil la legătura care se scindează; *p*H-ul optim de acţiune este cuprins între 9 şi 11, dar rămân active şi în domeniul de *p*H 5–9. Aceste proteaze sunt inhibate de DIFP, inhibitorul izolat din cartofi, fluorura de fenil-metil-sulfonil (PMSF). Activitatea lor nu este influenţată de TLCK, tosil-L-fenilalanin-clorometilcetonă (TPCK), EDTA, orto-fenantrolină (OP). În plus, proteazele alcaline serinice au activitate esterazică mare pe Cbz-aminoacizi, *p*-nitrofenilester (PNE), hidrolizând în general esterii terminali simpli. Proteazele alcaline au mase moleculare cuprinse între 25 000 şi 30 000 Da. Din acest grup fac parte proteazele cunoscute sub denumirea de subtilizine sau subtilopeptidaze. S-a constatat că aceste proteaze nu sunt

exclusiv produse de *Bacillus subtilis* ci, în general, de bacterii ale genului *Bacillus*, astfel încât s-a propus numele generic de *Bacilopeptidaze*. Pot fi clasificate în două grupe:

– *Bacilopeptidaze A*, care cuprind: subtilizină Carlsberg, protează alcalină din *B.licheniformis*, protează alcalină din *B.pumilis*;

– *Bacilopeptidaze B* care includ: subtilizină NOVO, protează alcalină din *B.subtilis NRRL B3411*, subtilizină BNP (Bacterial Protease Nagarse), protează alcalină din *B. subtilis var. amylosacchariticus*.

În prezent nu se poate face o diferențiere precisă între grupele A și B, chestiunea rămânând deschisă.

Metodele de examinare a amestecurilor de enzime produse de diferite microorganisme au arătat că microorganismele producătoare de *Bacilopeptidaze A* nu produc proteaze neutre sau amilază, în timp ce microorganismele producătoare de *Bacilopeptidaze B* produc proteaze neutre și amilază în același timp.

Metaloproteazele. Sunt proteaze activate de ionii metalici legați de centrul catalitic activ al enzimei (Ca^{2+}, Zn^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}). Ele pot fi grupate în: metaloproteaze neutre și metaloproteaze alcaline.

Metaloproteazele neutre conțin de obicei Zn^{2+} și prezintă specificitate de substrat față de aminoacizii hidrofobi implicați cu gruparea amino în legătura peptidică. Ele au un *p*H optim de acțiune cuprins între 7 și 8, sunt inhibate complet de EDTA (care complexează atomul de Zn^{2+} din structură) fiind sensibile la concentrații de EDTA sub 10^{-3} m, orto-fenantrolină. DIFP și PCMB nu scad activitatea acestor enzime. Metaloproteazele neutre au mase moleculare cuprinse între 35 000 și 45 000 Da.

Metaloproteazele alcaline conțin, de asemenea, un ion metalic implicat în mecanismul de reacție catalitică. Ele își manifestă activitatea optimă în domeniul de *p*H 7–9, fiind mai puțin inhibate de EDTA decât proteazele neutre, necesitând concentrații mai mari de 10^{-3} m EDTA pentru inactivare.

Reprezentanții cei mai importanți ai metaloproteazelor sunt proteazele neutre de origine bacteriană (*Bacillus sp.)* și de origine fungică (*Aspergillus sp.*). Proteazele neutre produse de diferite specii de microorganisme au structură și specificitate de reacție diferite. Astfel, proteazele neutre produse de *Bacillus subtilis var. amylosacchariticus* sunt diferite de proteazele neutre produse de *Bacillus subtilis NRRL B 3441* și din acest motiv este necesară specificarea exactă a provenienței proteazei neutre respective.

Studiile de specificitate și structură a proteazelor neutre purificate din *Bacillus subtilis var. amylosacchariticus* s-au efectuat în 1972 de către Tsuru prin modificarea chimică a unor resturi de aminoacizi din molecula enzimei. Modificarea chimică a resturilor tirozil prin acetilare cu acetilimidă, nitrare cu tetranitrometan sau iodurare provoacă pierderea activității enzimatice datorită

împiedicării sterice care se produce la interacţiunea dintre enzimă şi substratul cu masă moleculară mare. Ionizarea resturilor tirozil reduce activitatea hidrolitică a enzimei faţă de substanţele cu masă moleculară mai mică, iar fotooxidarea restului histidinic este critică pentru activitatea enzimatică. Modificarea unui rest triptofanil prin tratare cu N-bromsuccinimidă determină o autodigerare rapidă şi degradarea enzimei cu formare de peptide cu masă moleculară mică. Aceasta demonstrează că restul triptofanil are un rol funcţional de stabilizare a moleculei de enzimă. Studii de specificitate ale enzimelor proteolitice au fost efectuate şi prin scindarea legăturilor peptidice din catenele A şi B ale insulinei. În ceea ce priveşte proteazele microbiene, datele de literatură de specialitate consultate se referă numai la acţiunea acestora asupra catenei B a insulinei. Astfel, prin studii efectuate cu peptide sintetice şi prin examinarea produşilor de hidroliză ai catenei B a insulinei s-a demonstrat că proteazele neutre din *Bacillus subtilis* sunt endopeptidaze care scindează preferenţial legăturile peptidice formate de gruparea amino a leucinei sau a fenilalaninei.

Relativ recent Morihara a studiat structura proteazei neutre din *Bacillus subtilis var. amylosaccharíticus* prin fotooxidare în prezenţa albastrului de metilen, tratament prin care enzima a fost rapid inactivată. Enzima inactivă a fost hidrolizată cu endoproteinază fungică, peptidele rezultate fiind separate prin HPLC, iar secvenţa aminoacizilor s-a comparat cu cea a enzimei native. S-a văzut astfel că dintr-o peptidă lipseşte His^{228} faţă de prima formă, indicând că ea a fost fotooxidată. Aceasta sugerează că His^{228} este implicată în reacţia catalitică a proteazei neutre.

Studiul computerizat a 5 metaloproteinaze cunoscute a condus la cunoaşterea regiunii din structura acestora, răspunzătoare de termostabilitatea lor. Astfel s-a ajuns la concluzia că proteazele din *Bacillus amyloliquefaciens* şi *Bacillus subtilis* pierd 2 Ca^{2+} legaţi de situsul catalitic activ datorită substituirilor $Asp–Ser^{57}$, $Asp–Thr^{59}$ şi $Asp–Pro^{200}$, în timp ce termolizina din *Bacillus thermoproteolyticus* şi proteaza din *Bacillus stearothermophilus* conservă 3 Ca^{2+} legaţi de acest situs, iar proteaze cu termostabilitate intermediară din *Bacillus cereus* pierd numai un atom de Ca^{2+} substituindu-l cu Lys^{197}. Multiplele substituţii înăuntrul regiunii 91–101, 150–154 şi 275–280 corespund, de asemenea, unei scăderi a termostabilităţii proteinazei. Prin analiză cu raze X a termolizinei s-a determinat că aceste regiuni sunt aranjate spaţial împreună, fiind localizate lângă α-helixul central opus situsului catalitic activ, întreţinând contactul între capetele N şi C terminale.

Termolizina produsă de *Bacillus thermoproteolyticus* este o metal–neutral proteinază tipică, cu specificitate faţă de resturile hidrofobe sau voluminoase de aminoacizi, localizate la extremitatea aminoterminală a punctului de sciziune a substratului peptidic sau proteic. Ea se deosebeşte de toate celelalte proteaze neutre

prin stabilitatea neobişnuită (în soluţie reţine cca 90% din activitate după 30 min, la 70°C), activitate maximă la *p*H cuprins între 7,0 şi 9,0, în timp ce alte proteaze au un maxim de activitate la *p*H între 7,0 şi 7,5. De asemenea, ea are o specificitate de substrat deosebită de a celorlalte proteaze, catalizând şi reacţia inversă de sinteză a di- şi tripeptidelor. Această enzimă a fost foarte mult studiată şi descrisă de Morihara. Studiile s-au efectuat pe o enzimă produsă de *Bacillus thermoproteolyticus Rokko,* care a fost izolată de Endo.

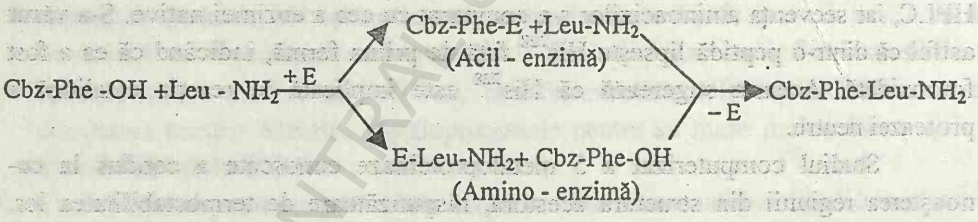
Isowa şi colaboratorii au fost primii care au arătat că termolizina poate cataliza reacţiile de sinteză a peptidelor:

$$Cbz–X–OH + Y–OMe \text{ (ori } Y–NH_2) \longrightarrow Cbz–X–Y–OMe \text{ (ori } Cbz–X–Y–NH_2)$$

Din studiul reacţiilor de transpeptidare s-a dedus că termolizina, catalizând aceste reacţii, urmează ambele căi *acil* şi *amino-intermediar*, în funcţie de substrat. Un mecanism similar a fost propus pentru pepsină. Pe de altă parte, un mecanism *acil-enzimă* s-a stabilit pentru reacţia cu α-chimotripsină.

Studiile au arătat că termolizina este un catalizator foarte bun pentru cuplarea Cbz–Phe–OH şi Leu–NH_2.

S-a postulat următoarea cale de sinteză:



Viteza reacţiei de sinteză este determinată de intermediarul acil- sau amino-enzimă, deoarece acesta devine un virtual substrat. Urmează faza rapidă de deacilare sau deaminare care este asemănătoare celei din cataliza uzuală.

Numeroase studii au indicat că termolizina are o activitate de sinteză foarte mare în comparaţie cu α–chimotripsina. Acest fapt poate fi atribuit exclusiv activităţii catalitice şi nu diferenţei de mecanism catalitic.

Structura termolizinei a fost mult studiată, determinându-se compoziţia în aminoacizi: Asp 43, Thr 23, Ser 23, Glu 20, Pro 8, Gly 36, Ala 28, Cys 1, Val 24, Met 2, Ile 18, Leu 17, Tyr 29, Phe 10, Lys 12, His 9, Arg 10, Trp 5, NH_3 38. O altă compoziţie a fost raportată pe baza determinărilor de masă moleculară de către H.Matsubara. Secvenţa terminală de aminoacizi dată de Matsubara este Ile–Thr–Gly–Thr. Masa moleculară a termolizinei determinată prin metoda echilibrului de sedimentare este de 37 500 Da.

Alţi autori au studiat structura termolizinei prin RMN, obţinând infomaţii privind conformaţia acesteia. Astfel s-a constatat că în porţiunile 233–248, 258–276 şi 299–316 fiecare fragment conţine câte un α–helix.

Studiile comparative de structură a termolizinei şi a proteazelor neutre înrudite au arătat că în timpul catalizei structura enzimei respective suferă deplasări ale legăturilor în punctele de articulare. S-au studiat trei proteaze bacteriene neutre din familia termolizinei: enzima din *Bacillus thermoproteolyticus,* proteaza neutră din *Bacillus cereus* şi elastaza din *Pseudomonas aeruginosa,* toate trei în formă liberă sau legată de un ligand. Fiecare enzimă conţine un domeniu N-terminal şi C-terminal cu un situs catalitic activ funcţional formând două domenii. Comparând diferitele enzime, s-a constatat că în interiorul domeniilor structura este bine conservată, dar există deplasări ale unui domeniu faţă de celălalt de aproape 16°. Această mişcare de domenii poate fi corelată cu prezenţa sau absenţa unui inhibitor. Legarea inhibitorului apare ca fiind asociată cu reducerea unghiului de deplasare cu 6 – 14° şi scăderea "şanţului" de lângă situsul catalitic activ cu aproximativ 2Å. Determinarea densităţii electronice în situsul catalitic activ al enzimei arată că aceasta ar corespunde mai mult unui complex inhibitor–enzimă sau unui complex enzimă – produs, decât unei enzime libere cum se presupusese.

Studiile de structură oferă informaţii despre stabilitatea termolizinei. Interiorul cavităţii hidrofobe a fost studiat prin tehnica mutagenezei directe de situs, efectându-se modificări de aminoacizi şi apoi studii de stabilitate. Efectele drastice asupra activităţii enzimatice au fost produse de următoarele substituţii: $Leu^{284} \rightarrow Trp$ şi $Met^{168} \rightarrow Trp$. La 50°C enzima şi-a pierdut ireversibil 50% din activitate, în 30 de minute. Aceste rezultate pot fi explicate prin efectul determinat de mutaţii. De asemenea, pot fi luate în considerare atât confuguraţia locală a enzimei care predispune la autoliză, cât şi alterarea miezului hidrofob ale enzimei native.

Un studiu amănunţit al specificităţii de substrat al termolizinei efectuat prin hidroliza proteinelor a evidenţiat că termolizina hidrolizează legături peptidice în care sunt implicate grupări amino ale aminoacizilor hidrofobi cu catene voluminoase: izoleucină, leucină, valină, fenilalanină, metionină şi alanină. Cu toate acestea, locul unde se găsesc aminoacizii tirozină, glicină, treonină şi serină este, de asemenea, foarte important pentru procesul de hidroliză. Acest din urmă caz s-a observat în special când timpul de hidroliză este mai lung sau raportul de concentraţii enzimă/substrat este mai mare. Hidroliza la nivelul restului de triptofan nu este nici pe departe clară. În tabelul 14.2 sunt date legăturile peptidice din diferite proteine şi peptide hidrolizate de termolizină. Pe lângă aceste cazuri a fost evidenţiată şi hidroliza legăturilor: $Tyr–Glu^{19}$. $Thr–His^{23}$. $Thr–Asn^{24}$.

Ser–$CySO_3H$[24], Gly–His[24], Thr–Asn[27], His–Asn[26], Arg–His[21], Gly–$CySO_3H$[24] şi Glu–Thr[28]. Totuşi, nu este clar dacă aceste hidrolize sunt cauzate de termolizină sau de enzimele contaminante. Studii efectuate cu substraturi sintetice au condus la aceleaşi rezultate ca în cazul utilizării de substrate naturale.

Termolizina nu are activitate amidazică şi esterazică, dar are o puternică activitate elastazică.

Termolizina nu rupe legătura peptidică ce conţine gruparea carboxil a prolinei, indiferent de prezenţa sau absenţa restului de aminoacid ataşat de aceasta. Termolizina are aceeaşi specificitate şi la temperaturi extreme. Specificitatea mică a termolizinei face ca ea să fie folosită în studiile de determinare a secvenţei aminoacizilor în proteine. Şi alte enzime proteolitice au acţiune asemănătoare termolizinei, catalizând reacţia de sinteză a diferitelor peptide, însă modul de acţiune este diferit, randamentele sunt mai mici, termolizina fiind enzima proteolitică cel mai mult utilizată în acest scop.

Tabelul 14.2

Resturile de aminoacizi implicaţi în hidroliza cu termolizină

R_2	R_1
Ile	Lys, Arg, Cys (Cm)*, Asp, Glu, Asn, Gln, Thr, Ser, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe
Leu	Lys, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Thr, Ser, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp
Val	Lys, Arg, Cys (Cm)*, Asp, Glu, Asn, Gln, Thr, Ser, Pro, Gly, Leu, Tyr, Phe, Trp, Lys (Me)**
Phe	Lys, Arg, Asp, Glu, Gln, Thr, Ser, Gly, Ala, Met, Leu, Phe
Ala	Lys, Arg, $CySO_3H$, Asp, Asn, Thr, Ser, Ala, Tyr, Phe
Met	Lys, Asp, Gly, Ala, Leu, Tyr, Gln
Tyr	Arg, Gln, Tyr, Phe, Lys, Ala
Thr	Lys, His, Arg, Ser, Tyr
Ser	Arg, Ser, Ala, Tyr, Phe
Gly	Thr

* – S-carboximetilcisteină; ** – ε-N-metillizină.

14.5.2. Proteaze fungice din *Aspergillus oryzae*

Microorganismele de *Aspergillus oryzae* produc un amestec de proteaze acide, neutre şi alcaline, cele neutre fiind preponderente. Proteaza neutră fungică este o metaloprotează tipică şi are proprietăţi caracteristice asemănătoare cu cele enumerate pentru proteazele bacteriene. Studiind structura proteazelor alcaline produse de *Aspergillus oryzae,* un grup de cercetători japonezi au stabilit că acestea

au secvențe de aminoacizi similare subtilizinelor și că resturile de aminoacizi Asp^{41}, His^{72} și Ser^{228} formează situsul catalitic activ.

Dintr-un amestec de enzime produs de *Aspergillus oryzae* prin cromatografie pe DEAE Sephadex A-50 și Bacitracin-Sepharose 4B, a fost izolată o protează serinică având o activitate optimă în domeniul de *p*H 6,7–8,2. Proteinaza este complet inhibată de fenil-metil-sulfonilfluorură și diizopropilfluorofosfat și are pH_i la *p*H = 7,5. Masa moleculară a serin-proteinazei este 30 000 Da. Compoziția în aminoacizi este: Met_2, Asp_{33}, Thr_{18}, Ser_{29}, Glu_{21}, Pro_9, Glu_{32}, Ala_{38}, Val_{24}, Ile_{16}, Leu_{15}, Tyr_8, Phe_8, His_8, Lys_{18}, Arg_4, Trp_6. Secvența terminală a serin-proteazei este: Gly-Leu-Phe-Thr-Gln-Lys-Ser-Ala-Pro-Trp-Gly-Gln-Leu-Gly-Ser-Ile-Ser-Lys-Gly-Gln-Gln-Ser-Thr-Asp-Tyr-Ile-Tyr. Această secvență coincide practic cu secvența corespunzătoare proteinazei din *Aspergillus oryzae*, tulpina *ATCC20386*.

Similar subtilizinelor, această enzimă catalizează condensarea leucin- și alanin-*p*-nitroanilidelor cu esterii metilici ai N-benzil-oxicarbonil-alanil-alanină și glicil-alanină.

14.6. METODE DE IZOLARE ȘI SELECȚIE A MICROORGANISMELOR PRODUCĂTOARE DE ENZIME PROTEOLITICE

Microorganismele capabile să producă enzime proteolitice, într-o oarecare măsură, pot fi izolate din diferite habitate: sol, aer, apă, din diferite alimente, furaje, produse vegetale.

Metodele clasice de screening al microorganismelor cu potențial proteolitic se bazează pe proprietatea enzimelor biosintetizate de a hidroliza proteinele adăugate în mod intenționat în mediul de cultură. Practic, metoda constă în cultivarea acestora în plăci Petri pe mediu agarizat ce conține cazeină la temperatura optimă specifică tulpinii respective și determinarea zonelor de hidroliză (transparente) ce apar în jurul coloniilor. Dacă se dorește izolarea de enzime proteolitice active într-un anumit domeniu de *p*H, se modifică de la început *p*H-ul cazeinei și mediului agarizat la valoarea dorită.

14.6.1. Metoda inoculării pe un mediu minimal

Metoda inoculării pe un mediu minimal poate fi aplicată atât pentru selecții naturale ale tulpinilor cât și pentru selecția celor supuse anterior unui proces de mutageneză. De exemplu, această metodă a fost utilizată pentru selecția tulpinilor

de *Bacillus subtilis* şi *Aspergillus oryzae* cultivate pe medii minimale specifice (SMM şi respectiv MAM descrise în subcapitolele 14.7.1 şi respectiv 14.9.2) (Ioniţă A. şi colab.).

Materialul de lucru pentru iradiere în cadrul lucrărilor de mutageneză efectuate la tulpinile de *Bacillus subtilis* a fost suspensia de celule în mediu minimal dezvoltată timp de 6 ore pe agitatorul rotativ cu 220 rot/min, la 31°C, aflată la sfârşitul fazei logaritmice de creştere.

Activitatea proteolitică a tulpinilor mutante, obţinute prin cultivarea acestora pe mediul de fermentaţie minimal, timp de 48 de ore, în condiţii de agitare la temperatura de 31°C, s-a determinat prin metoda Anson.

În cazul tulpinii *Aspergillus oryzae*, pentru mutageneză a fost folosită suspensia de celule obţinută pe un mediu minimal timp de 60–64 de ore, în condiţii de agitare la 220 rot/min, la 31°C, aflată la începutul fazei staţionare de creştere.

Din suspensia de celule mutagenizate, coloniile au fost izolate prin însămânţare pe medii agarizate cu YPG şi incubate la 31°C, timp de 72 de ore. Coloniile izolate au fost apoi cultivate pe mediul martor (*M*), determinându-se activitatea proteolitică în lichidul extracelular.

14.6.2. Metoda difuziei radiale

Metoda difuziei radiale se bazează pe acţiunea enzimelor asupra substanţelor specifice incluse în gel de agar sau agaroză şi evidenţierea produşilor de reacţie, care apar sub forma unor zone de difuzie, prin tehnici colorimetrice specifice. Proporţionalitatea dintre diametrul zonelor de difuzie şi activitatea enzimatică permite selectarea acelor tulpini care produc enzimele de interes într-o cantitate satisfăcătoare.

Difuzia radială în gel de agar s-a utilizat ca metodă de screening pentru selectarea tulpinilor de *Bacillus subtilis*, producătoare de proteaze alcaline.

Metoda s-a aplicat în două variante care sunt prezentate în continuare:

– pentru mutantele izolate din suspensia de celule iradiate şi dezvoltate pe mediul minimal, inocularea s-a realizat pe mediul cu geloză nutritivă, conţinând 0,1% cazeină în tampon Tris HCl 0,1 m, la *p*H = 8,5. După incubare 18 ore la 31°C, în jurul coloniilor se pot evidenţia zone de hidroliză al căror diametru s-a comparat cu cel al tulpinilor parentale;

– mutantele izolate din suspensia de celule iradiate s-au dezvoltat pe mediul minimal timp de 18 ore pe agitatorul rotativ. După cultivare, în lichidul de cultură obţinut prin filtrare, activitatea enzimelor proteolitice s-a determinat prin difuzie radială în gel de agar 1%, conţinând cazeină 0,1% în tampon Tris HCl 0,1 m, la *p*H = 8,5. După o incubare de 18 până la 20 ore, la 33°C, plăcile s-au imersat în fixator (acid acetic – etanol – apa) (2:60:38), timp de 2 ore şi apoi în

Amidoblack 0,1%, timp de 15 minute. După spălări repetate în acid acetic 7 %, zonele de difuzie apar sub forma unor pete albe pe un fond albastru (fig 14.3).

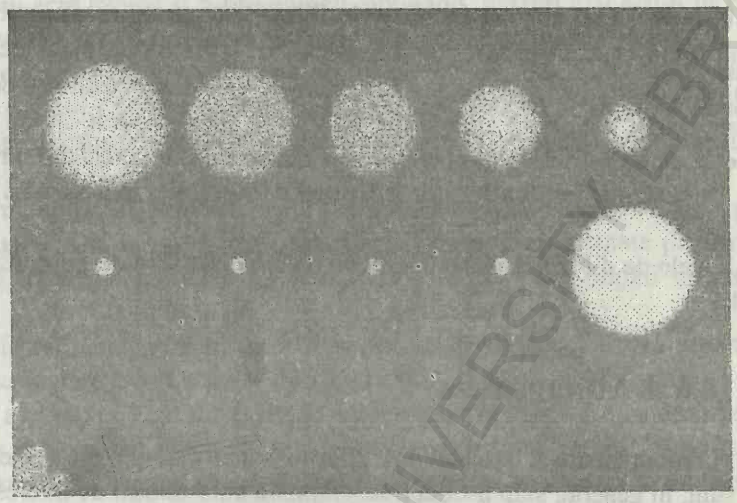


Fig. 14.3. Difuzia radială în gel de agar a subtilizinei NOVO.

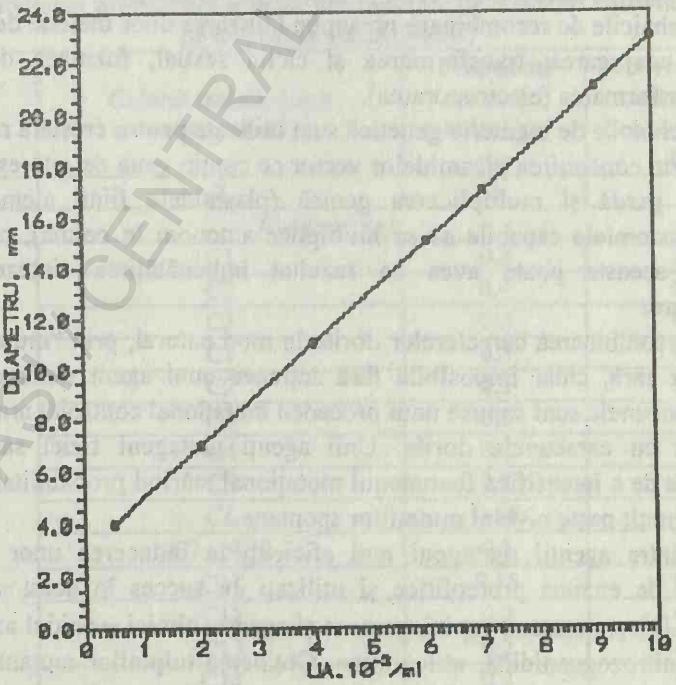


Fig.14.4. Curba standard de Subtilizină NOVO.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În cazul tulpinii *Aspergillus oryzae*, metoda de determinare a activității proteolitice prin difuzie radială utilizată ca metodă de screening s-a aplicat în următoarea variantă: mutantele izolate din suspensia de celule iradiate și dezvoltate pe mediul martor (M) au fost incubate în Plăci Petri pe un mediu nutritiv YPG, conținând 0,1% cazeină în tampon Tris HCl, $pH = 7,2$; după incubare 72 ore la 31°C, în jurul coloniilor însămânțate apar zone de hidroliză vizibile cu ochiul liber. S-a măsurat apoi diametrul zonelor respective și s-a comparat cu cel al tulpinii parentale a cărei activitate protează s-a determinat în prealabil prin metoda Merck. S-a calculat raportul dintre diametrul zonei de hidroliză și diametrul coloniei R/r.

Zonele de difuzie s-au comparat cu o curbă standard de Subtilizină NOVO (fig.14.4).

14.6.3. Mutageneza

Microorganismele izolate din diferite surse naturale prin metodele cunoscute sunt, în general, slab productive. Obținera unor tulpini de interes practic se realizează prin schimbarea structurii lor genetice. Tehnicile utilizate în scopul schimbării structurii genetice a microorganismelor constau în mutații și selecții, tehnici de recombinare *in vivo* și tehnici de inginerie genetică.

Tehnicile de recombinare presupun utilizarea unor metode de transformare a ADN: conjugarea, transformarea și ciclul sexual, fuziunea de protoplaști, electrotransformarea (electroporarea).

Tehnicile de inginerie genetică sunt utilizate pentru creștera ratei de sinteză a ARN, prin construirea plasmidelor vector ce conțin gena de interes, introducerea în celule gazdă și multiplicarea genică (plasmidele fiind elemente genetice extracromozomiale capabile să se multiplice autonom în celulă), realizând copii multiple; aceasta poate avea ca rezultat îmbunătățirea sintezei enzimatice intracelulare.

Recombinarea caracterelor dorite în mod natural, prin "mutații" spontane, este foarte rară, chiar imposibilă fără acțiunea unui agent mutagen. De aceea, microorganismele sunt supuse unui procedeu mutațional controlat urmat de selecția indivizilor cu caracterele dorite. Unii agenți mutageni fizici sau chimici au capacitatea de a intensifica fenomenul mutațional mărind probabilitatea de apariție a acestuia mult peste nivelul mutațiilor spontane.

Dintre agenții mutageni mai eficienți în inducerea unor mutanți înalt productivi de enzime proteolitice și utilizați cu succes în acest scop amintim: radiațiile UV, γ, neutronii rapizi, precum și agenți chimici – acidul azotos, nitrozoetilureea, nitrozoguanidina, etilenimina. Obținerea tulpinilor mutante eficiente se realizează prin tratarea culturilor parentale cu unul din agenții mutageni menționați sau prin acțiunea combinată a doi, trei mutageni diferiți. Mutageneza poate fi

realizată, de asemenea, prin tratarea hibrizilor obţinuţi în fuziunea de protoplaşti, după regenerarea culturii în prezenţa unor factori mutageni.

Astfel, Michalik şi colab. (1995) au efectuat selecţii la *Bacillus licheniformis*, cu acid azotos şi 5-bromuracil, obţinând mutanţi mai activi în biosinteza de proteaze alcaline de cca 2 ori mai productivi decât tulpina parentală.

De asemenea, Wang, Weimin şi colab. (1987, 1993) au obţinut, prin mutageneză cu radiaţii γ şi nitrozoguanidină, o tulpină mutantă de *Bacillus licheniformis* ce produce o protează alcalină cu 70% mai activă decît cea obţinută din tulpina parentală.

Unii autori au prezentat date privind îmbunătăţirea potenţialului productiv prin mutageneză la fungi. Astfel, Singh (1980) a obţinut mutante pentru proteaze acide prin tratament mutagen cu acid azotos asupra unor tulpini de *Aspergillus niger*.

Efectul mutagen stimulator al N-nitrozo-N-etil-ureei asupra unei tulpini de *Aspergillus oryzae* a fost studiat de Khamidulin şi colab. (1989) care au obţinut o creştere a mutanţilor înalt productivi prin combinarea dozei şoc cu doze prelungite, activitatea proteolitică în culturile selecţionate crescând de cca 20 de ori faţă de tulpina parentală. Se menţionează faptul că efectul obţinut prin mutageneză, în acest caz, îşi păstrează reproductibilitatea timp de opt generaţii.

Tabelul 14.3

Activitatea proteolitică a tulpinilor mutante de *B.subtilis* cultivate pe mediul minimal (SMM)

Doza de iradiere, kr	Colonii izolate după mutageneză	Diametrul zonei de hidroliză, cm	Activitatea proteolitică la 48 ore fermentaţie, UA/l
1	2	3	4
Mutageneza I			
90	C1	0,3	0,13
	C2	0,4	0,48
	C3	0,3	0,10
120	C1	0,3	0,15
	C2	0,2	0,24
	C3	0,2	0,18
	C4	0,2	0,22
	C5	0,2	0,20
	C6	0,15	0,18
	C7,8,9,10	0,1	–
	C11	0,15	0,18
	C12	0,2	0,24
	C13	0,2	0,27
	C14	0,2	0,19
	C15	0,3	0,39

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Tabelul 14.3 (continuare)

1	2	3	4
Mutageneza II			
60	C1,2,3,4,5,7,8,9,10,11,12,13,14	0,15–0,20	–
	C6	0,40	0,78
	C7-22	0,2	0,2
	C23	0,30	0,32
	C24	0,25	0,25
90	C1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	0,15–0,2	–
	C14	0,25	0,62
	C15,16,17,18,19	0,18–0,20	–
	C20	0,30	0,53
	C21	0,60	–
	C22	0,30	–
	C23,24,25,26,27,28,29	0,18–0,22	–
120	C1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13	0,17–0,20	–
	C14	0,28	0,22
	C15,16,17,18,19,20	0,18–0,20	–
	C21	0,39	0,66
	C22	0,39	0,55
Martor	Tulpina parentală *Bacillus subtilis* IFO 3039	0,18	0,25

La noi în țară menționăm lucrările de mutageneză cu neutroni rapizi, efectuate de colectivul ICCF, asupra unor tulpini de *Bacillus subtilis* producătoare de proteaze neutre și obținerea unui mutant *Bacillus subtilis* ICCF-22a, producător de proteaze active în domeniul de *p*H alcalin (Ioniță A, Jurcoane Șt.) (tabelul 14.3).

Activitatea protezică a tulpinilor mutante de *Bacillus subtilis* obținute în aceste experiențe s-a determinat atât calitativ, prin metoda difuziei radiale în gel de agar 1%, conținând cazeină 0,1% (fig. 14.5), cât și prin determinarea cantitativă a activității enzimatice în lichidul de cultură obținut după cultivarea timp de 48 ore, pe mediu minimal (SMM), a coloniilor izolate prin mutageneză (tabelul 14.3).

În urma studiilor de mutageneză s-a observat apariția unor diferențe între coloniile izolate din suspensia de celule iradiate. Astfel, dacă coloniile care aparțin suspensiei de celule înainte de iradiere prezentau zone de difuzie egale la testul cu cazeină, fapt care dovedește uniformitatea genetică a populației de microorganisme, după mutageneză, au apărut diferențe privind mărimea zonei de hidroliză a substratului. Diametrul zonei de difuzie s-a dovedit a fi proporțional cu activitatea proteolitică la $pH = 8,5$ a coloniilor de *Bacillus subtilis* izolate. Experiențele de mutageneză s-au efectuat în două etape. Dintre coloniile izolate după prima mutageneză – realizată prin iradierea cu o doză de 90 kr – colonia notată C2 a avut un potențial productiv de două ori mai ridicat decât tulpina

parentală. În etapa următoare de mutageneză, pentru iradiere s-a utilizat o suspensie de celule provenită din colonia C2 şi a fost izolată colonia C6 cu un potenţial productiv de trei ori mai ridicat decât tulpina parentală, respectiv 0,78 UA/l faţă de 0,25 UA/l.

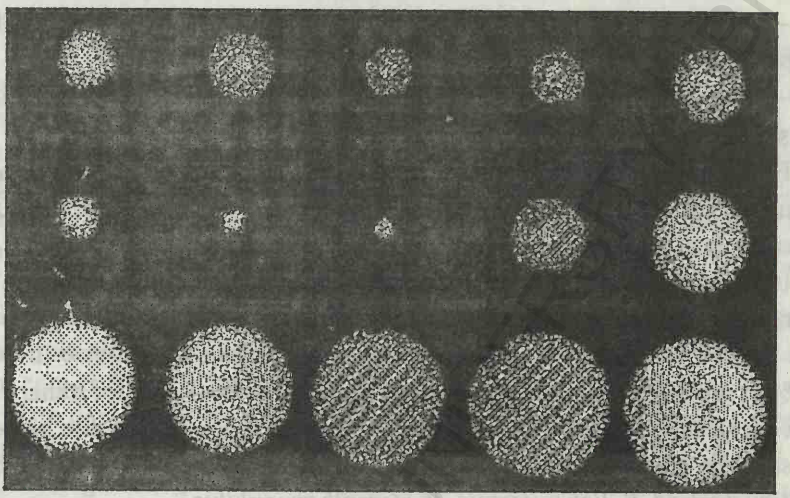


Fig.14.5. Difuzia radială, la *p*H = 8,5 a proteazelor obţinute prin fermentaţii cu tulpini mutante de *B.subtilis*.

În ceea ce priveşte tulpina de colecţie *B.subtilis* ICCF 22, al cărei potenţial de biosinteză a proteazelor alcaline a fost din start mai ridicat – 3,2 UA/l – aceasta a fost supusă unor proceduri de selecţie naturală în scopul adaptării la *p*H alcalin. Astfel s-au efectuat pasaje succesive în eprubete şi pe plăci Petri care conţineau geloză nutritivă la *p*H alcalin (8–8,5). După incubare, timp de 48 ore, la 37°C s-au izolat coloniile cu diametrul cel mai mare. Adaptarea tulpinii la *p*H alcalin s-a realizat după un număr de 25–30 de treceri succesive. Caracterele morfologice ale culturii respective (cultură în plajă, cu aspect rugos, mat) erau asemănătoare cu ale tulpinii iniţiale cultivată pe geloză nutritivă la *p*H = 6,5 – 7,0. Tulpina adaptată la *p*H alcalin s-a notat *B. subtilis* ICCF 22a. Această tulpină a fost ulterior utilizată în experienţele de selecţie naturală pentru izolarea de colonii tipice rugoase "R", cu aderenţă la substrat şi cu productivitate mare.

14.6.4. Fuziunea de protoplaşti

Fuziunea de protoplaşti este o tehnică de mare importanţă pentru biotehnologie. Ea permite reunirea într-o singură celulă a două sau mai multe genomuri diferite şi complete. Protoplastul reprezintă ansamblul structurilor celulare rămase dintr-o bacterie după îndepărtarea integrală a peretelui celular.

Fuziunea de protoplaşti cuprinde următoarele etape:

– îndepărtarea peretelui celular şi obţinerea protoplaştilor, care se realizează în general cu lizozim;

– fuziunea protoplaştilor în prezenţa substanţelor stimulatoare: PEG şi $CaCl_2$;

– regenerarea peretelui celular cu ajutorul agenţilor stabilizanţi (gelatină, serumalbumină etc.);

– reversia, prin care se formează o nouă generaţie de celule din protoplaştii fuzionaţi.

Fuziunea de protoplaşti poate fi aplicată atât bacteriilor din genul *Bacillus*, cât şi fungilor filamentoşi din genul *Aspergillus*, pentru creşterea randamentului în biosinteza de enzime proteolitice.

În prezent s-au pus la punct metode de introducere a moleculelor de ADN recombinat într-o celulă bacteriană gazdă prin transformare de protoplaşti mediată de PEG. Eficienţa transformării protoplaştilor cu ADN recombinat este în general de 1–10% şi are marele avantaj că se pot folosi atât molecule monocatenare cât şi molecule bicatenare de ADN. Metoda este aplicată cu succes la speciile bacteriene la care se obţin rapid protoplaşti stabili în mediu osmotic, în special la bacili: *B. amiloliquefaciens, B. licheniformis, B. stearothermophilus.*

Protoplaştii de *Bacillus subtilis* pot fi transformaţi cu ADN plasmidial. În literatura de specialitate s-a menţionat o eficienţă de 50–80 % a celulelor regenerate. Metoda de obţinere a protoplaştilor la *B. subtilis* a fost pusă la punct de Chang şi Cohen (1979).

În mod cert transformarea de protoplaşti are avantaje, dar şi dezavantaje. Dintre avantaje amintim aplicarea la o mare varietate de specii de *Bacillus*.

Dintre dezavantajele acestei tehnici menţionăm faptul că protoplaştii sunt fragili şi se sparg repede chiar în medii stabilizate osmotic, iar regenerarea se desfăşoară uneori cu eficienţă scăzută (circa 10% din celulele protoplastizate) şi necesită un timp lung pentru regenerare. Metodele necesită medii complete, sunt laborioase şi rezultatele se reproduc greu.

14.6.5. Metode de inginerie genetică

Mărirea gradului de eficacitate a tehnologiilor de biosinteză a enzimelor se realizează astăzi pe scară largă prin utilizarea tehnicilor de recombinare genetică în lucrările de îmbunătăţire a potenţialului productiv al tulpinilor implicate în proces.

Mecanismul de reglare a biosintezei proteazelor la tulpini de *B.subtilis*. Obţinerea de tulpini de interes bioproductiv, prin metodele ingineriei genetice, prezintă un interes deosebit în domeniul biotehnologiei. Majoritatea suşelor producătoare astfel obţinute constituie elementul esenţial al rentabilităţii tehnologiilor

de biosinteză. O problemă de interes major o constituie obținerea de tulpini bacteriene înalt producătoare de enzime.

Există o literatură de specialitate bogată referitoare la structura genetică a microorganismelor aparținând speciei *B. subtilis* și la mecanismul de producere a proteazelor. Astfel, producerea de proteaze extracelulare de către *B. subtilis* este un proces complex, cuprinzând o rețea de regulatori pozitivi și negativi.

Copii multiple ale genelor *deg* R, *deg* Q, *sen* S și *ten* A sunt implicate în superproducția proteazelor extracelulare. Pe de altă parte, locusurile *abr* B, *hpr*, *sin* și *pai* sunt implicate în reglarea negativă, astfel încât produșii în exces ai acestor gene inhibă producția de exoproteaze. În această rețea de reglare complexă, sistemul *deg* S – *deg* U joacă un rol central. În același timp, senzorul de tip kinasa *deg* S acceptă stimuli din mediul înconjurător, își autofosforilează propriul rest de histidină și transferă fosfatul de la restul de aspartat regulatorului înrudit *deg* U. Gena *deg* S este implicată în defosforilarea *deg* U fosforilate.

Este deja demonstrat că forma fosforilată a genei *deg* U este stabilizată de copii multiple ale genei *deg* R sau de mutații ce cauzează hiperproducția exoproteazelor, cum ar fi *deg* S 100, *deg* S 200, *deg* U 32 și *deg* U9.

Este dovedit că gena *pro* B mărește producerea de proteaze acționând în mod sinergic cu copii multiple ale genei *deg* R și că efectul genei *pro* B este dependent de gena *deg* S. Este posibil ca glutamyl-fosfatul care este un compus intermediar al genei *pro* B în timpul biosintezei prolinei să servească drept donor de grupare fosfat cu greutate moleculară mică pentru sistemul bicomponent *deg* S – *deg* U.

Pentru clonarea genei răspunzătoare de producția de proteaze s-a pus la punct o metodă de clonare tip țintă a ADN de *B. subtilis* în celule purtătoare de plasmida pNC 61 (care conține gena *deg* R) cu ajutorul vectorului pNC 6. Tulpinile bacteriene și plasmidele utilizate de diferiți autori sunt redate în tabelul 14.4.

Tabelul 14.4

Tulpini bacteriene și plasmide utilizate în lucrări de clonare în *B.subtilis* (după M.Ogura, M.Kawata ș.a., 1994)

Tulpină sau plasmidă	Descrierea genotipului
Tulpini de *B.subtilis* MI 112	arg 15, leu B8, thr 5 rec E 4 hsm M, hsr M
DB 104	his npr R2, npr E18 Δ apr E3
MT 33	his npr R2, npr E18 apr E' – lac Z
CU 741	trp C 2 leu C 7
Tulpini *E.coli* JM 109	recA 1 Δ (lac-pro AB) end A1 gyr A96 thi-l, has R17 rel A1 sup E 44
Plasmide pNC 6	Trimetoprim rezistentă
pNC 61	pNC 6 purtând gena *deg* R
pUBH 1	Kanamycin rezistentă
pLC 1	pUBH 1 purtând gena *pro* B

Tehnica de lucru a fost următoarea: ADN total din tulpina *B.subtilis* cu 741 şi vectorul ce conţine gena de rezistenţă la kanamicină pUBH 1 au fost fragmentate cu EcoR I, legate şi apoi transformate în celule MI 112 purtătoare de pNC 61 prin transformare de protoplaşti. Transformanţii rezistenţi la kanamicină şi trimethoprim au fost selecţionaţi pentru producerea de exoproteaze după mărimea haloului pe mediu solid. Dintre cei 2500 transformanţi, o colonie a arătat un halou extrem de mare comparativ cu cel al celulelor purtătoare de pNC 61 şi pUBH 1. Plasmida din acest transformant a fost denumită pLC 1. A fost studiat, de asemenea, şi efectul sinergic al pLC 1 cu plasmida pNC 61 purtând gena *deg* R. Celulele purtătoare a diferiţi derivaţi ai pNC 61 s-au examinat pe plăci de agar LBCG (mediu Luria-Bertani conţinând cazeină şi gelatină) (fig. 14.6). Gena *deg* R intactă este purtată pe pNC 61 ΔH 8 şi pNC 61 ΔR 5, în timp ce ea lipseşte în pNC 61 ΔV 10. S-a demonstrat că celulele purtătoare a pLC 1 plus pNC 61 ΔH 8 şi acelea care posedă pLC 1 plus pNC 61 ΔR 5 produc un halou la fel de mare ca cel observat la celulele purtând pLC 1 şi pNC 61. În schimb, celulele purtătoare de pLC 1 şi pNC 61 ΔV 10 au un halou similar cu cel observat pentru celulele purtătoare de pLC 1 şi pNC 6. Pe baza acestor date s-a tras concluzia că efectul sinergic al pLC 1 depinde de gena *deg* R.

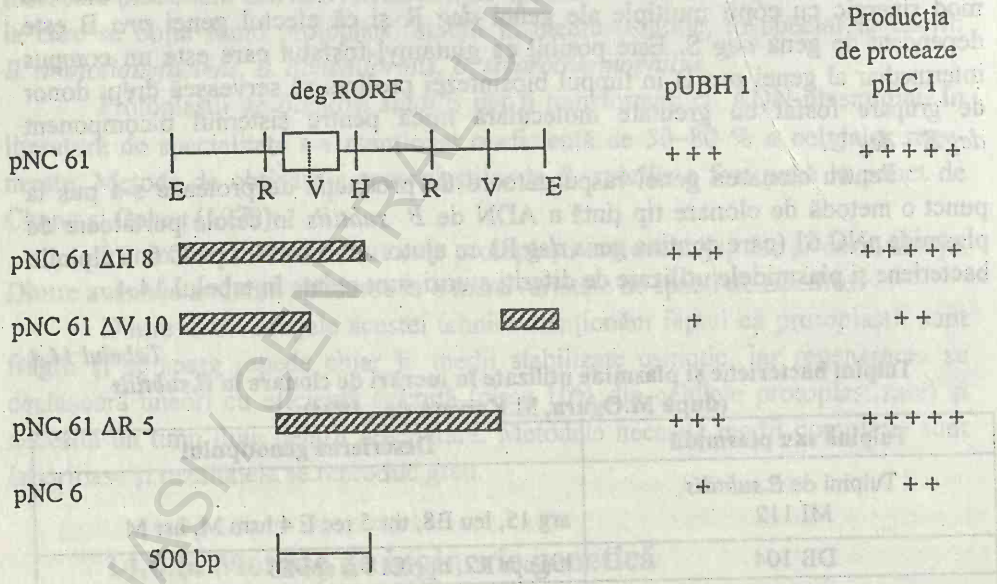


Fig. 14.6. Determinarea regiunii ADN din pNC 61 necesară pentru efectul sinergic cu pLC 1. Este redată harta de restricţie a fragmentului de 1,6 kb inserat în pNC 61: dreptunghiul nehaşurat reprezintă gena *deg* R; dreptunghiurile haşurate reprezintă regiuni din ADN ale pNC 61 rămase în plasmide; s-a măsurat mărimea haloului produs de celulele MI 112 purtătoare fie de pLC 1 fie de pUBH 1 împreună cu pNC 61 sau cu derivaţi ai acestora şi s-a notat cu +.

\+ 9,0 mm; ++ 9,0-10,5 mm; +++ 10,5-12,0 mm; +++++ 15,0 mm

Abrevieri E, Eco RI, H, Hind III, R, Rsa I, V, EcoRV.

Sinergismul s-a observat numai când *deg* R a fost prezent în multe copii ale plasmidei, deoarece mărirea cantității de proteaze a avut loc indiferent dacă *deg* R cromozomal a fost intact sau fragmentat (rupt). Gena *deg* R dintr-un ADN cromozomal fragmentat nu a avut efect asupra producției de proteaze, ceea ce arată că sinergismul depinde numai de cantitatea de *deg* R prezentă în celulă.

Pentru a stabili dacă pLC 1 își exercită, de asemenea, efectul sinergic și asupra unui alt regulator pozitiv *deg* Q, s-a construit plasmida pNQ 602, în care gena *deg* Q, purtată pe un fragment de 2,9 kb inserat în pBQ 1, s-a transferat pe un vector ce conține gena de rezistență la trimethoprim și introdus în celulele MI 33. În acest caz, nu s-a găsit un efect sinergic al pLC 1 cu pNQ 602. Aceasta sugerează faptul că efectul sinergic al pLC 1 este specific pentru *deg* R. S-a tras concluzia că pLC 1 cooperează cu pNC 61 în producția de exoproteaze.

Același studiu la care ne referim a determinat secvența genei responsabile de efectul stimulator asupra producerii de exoproteaze.

Astfel, s-a stabilit harta fizică a ADN inserat în pLC 1 și a diferitelor derivate construite așa cum se poate urmări în fig.14.7.

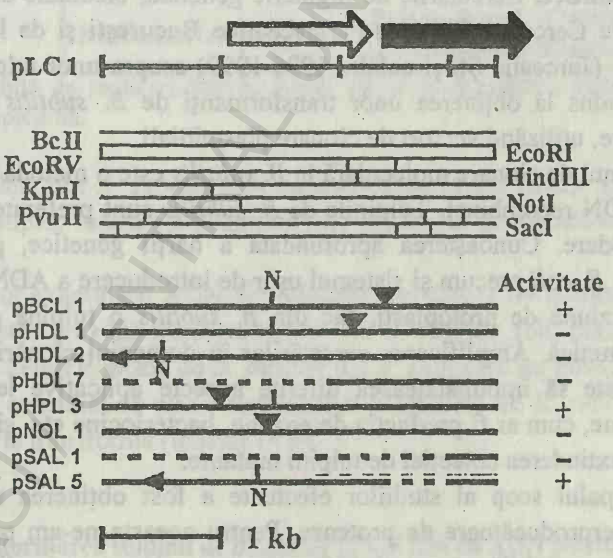


Fig.14.7. Harta de restricție a fragmentului de 3,5 kb inserat în pLC 1 și structura diferitelor plasmide derivate de la pLC 1:

linia punctată din pHDL 7, pSAL 4 și pSAL 5 indică segmentele de restricție obținute cu Not I din pLC 1, iar săgețile indică inversia fragmentelor de AND în plasmida corespunzătoare. În pHDL 2 este evidențiată prezența unei secvențe de 29 nucleotide provenită de la un alt vector; triunghiurile de culoare închisă indică poziția mutațiilor introduse iar + și – indică prezența sau absența efectului de mărire a producției de exoproteaze determinate prin mărimea haloului celulelor purtând pNC 61; plus și minus corespund la notațiile +++++ și, respectiv, +++ din fig. 14.6.

Producţia de exoproteaze de către tulpina *B. subtilis* MI 12 ce conţine plasmida pNC 61 şi una dintre plasmidele construite (fig.14.7) a fost determinată prin examinarea mărimii haloului de degradare a proteinelor pe mediu LBC 6. Mutaţiile variate introduse în pLC 1 având ca rezultat obţinerea plasmidelor: pBCL 1 (mutaţie la nivelul situsului unic Bcl 1 din pLC 1), pKPL 3 (mutaţie la nivelul situsului unic Kpn I) nu influenţează nivelul exoproteazelor produse de tulpina purtătoare. În schimb, mutaţiile induse la nivelul situsurilor unice *Not* I (pNOL 1) şi *Hind* III (pHOL 1) au inhibat producerea de proteaze. Plasmida pSAL 5 care conţine un fragment *Sac* I de 2,5 kb menţine activitatea enzimatică a tulpinii purtătoare.

De asemenea, inversia sau deleţia fragmentului *Hind* III (pHOL 2 şi respectiv pHOL 7) sau deleţia celor 2 fragmente *Sac* I (pSAL 4) din plasmida pLC 1 conduc la pierderea activităţii enzimatice.

Aceste rezultate arată că regiunea Kpn I – Bcl I de 1,4 kb este responsabilă de mărirea activităţii enzimatice.

Aplicaţii ale ingineriei genetice în obţinerea de tulpini producătoare de enzime proteolitice. Cercetările de inginerie genetică, efectuate de colectivele de la Institutul de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti şi de la Facultatea de Biotehnologie (Jurcoane Şt. şi colab., 1996-1999) asupra unor tulpini din colecţia ICCF, au condus la obţinerea unor transformanţi de *B. subtilis* producători de proteaze neutre, utilizând vectori de clonare plasmidiali.

Sistemul de clonare moleculară în *B. subtilis* este o metodă bine stabilită în studiile de ADN recombinat. Tulpinile de *B. subtilis* sunt preferate din mai multe puncte de vedere. Cunoaşterea aprofundată a hărţii genetice, posibilităţile de comparaţie cu *E. coli* precum şi sistemul uşor de introducere a ADN-ului în celula-gazdă prin fuziune de protoplaşti, fac din *B. subtilis* o tulpină potrivită pentru studiile de genetică. Amplificarea cercetărilor în domeniul clonării moleculare la *B. subtilis* poate să îmbunătăţească diferite aspecte aplicative legate de aceste microorganisme, cum ar fi producţia de enzime, bacteriocine etc. şi în acelaşi timp face posibilă extinderea colecţiei de tulpini mutante.

Principalul scop al studiilor efectuate a fost obţinerea unor tulpini de *B.subtilis*, hiperproducătoare de proteaze. Pentru aceasta ne-am propus obţinerea unei plasmide, capabilă să conţină în structura ei secvenţe din gena *pro* B (responsabile de mărirea producţiei de protează) şi apoi obţinerea prin transformare a unor celule conţinând mai multe copii ale genei *pro* B. Au fost studiate mai multe tipuri de plasmide conţinute fie de tulpini de *E. coli*, fie de *B. subtilis* (tabelul 14.5), în vederea alegerii variantei optime pentru transformare genetică la bacili. O parte din plasmidele utilizate au provenit din laboratorul dr. Zoltan Pragai, de la Universitatea de Ştiinţe Agricole din Gödöllo, Ungaria.

Tulpinile bacteriene şi plasmidele utilizate sunt cuprinse în tabelul 14.5.

Tabelul 14.5

Tulpini bacteriene şi plasmide utilizate în experienţele de modificare genetică a tulpinilor de *B. subtilis*

Tulpina sau plasmida	Genotip/descriere	Provenienţă
Tulpini		
E.coli ATCC 9637	Trim^r	ICCF
E.coli USAB 573	Trim^r	USAB Timişoara
B.subtilis ICCF 22 a		ICCF
B.subtilis USAB	Trim^r, Amp^r	USAB Timişoara
Plasmide		
pEC_1	Timethoprim rezistentă, derivată din *E.coli* ATCC	Obţinută şi caracterizată în laboratoarele Biological Research Center, Szeged, Ungaria
pBS_1	Ampicilin rezistentă derivată din *B.subtilis* USAB	Obţinută şi caracterizată în laboratoarele Biological Research Center, Szeged, Ungaria
$pUBC_{18}$*	Kanamicin rezistentă	Zoltan Pragai, Gödöllo, University of Agricultural Sciences, Ungaria

* Plasmidă capabilă de replicare atât în *E.coli* cât şi în *B. subtilis*, având rezistenţă la kanamicină şi ampicilină.

Plasmidele din *B. subtilis* sunt cunoscute ca având funcţii specifice determinând, de exemplu: rezistenţă la antibiotice, producţia de bacteriocine, producţia de enzime etc.

În scopul examinării ADN din tulpinile purtătoare de plasmide şi pentru a vedea dacă acestea prezintă analogie cu cel din *B. subtilis* 168, plasmidele izolate s-au introdus în celulele gazdă de *B. subtilis* ICCF 22a, care nu posedă rezistenţă la antibiotice. S-a constatat că pBS1 nu transformă celulele de *B. subtilis* ICCF 22a, dar pUBUC 18 le transformă (tabelul 14.6).

Tabelul 14.6

Transformarea tulpinii de *B.subtilis* ICCF 22a cu ADN plasmidial

Plasmidă	Provenienţă	Celulă-gazdă	Marker de selecţie	Nr. transformanţă, ml
pEC_1	*E. coli*	*B. subtilis* ICCF 22a	Trim	$2,3 \times 10^4$
pBS_1	*B. subtilis*	*B. subtilis* ICCF 22a	Amp	10
pUBUC 18	Recombinant *B.subtilis* şi *E.coli*	*B. subtilis* ICCF 22a	Km	$6,1 \times 10^6$

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Pentru examinarea efectului plasmidelor introduse în celulele de *B. subtilis*, bacteriile au fost cultivate pe plăci cu mediu LBCG conţinând cazeină şi antibioticele corespunzătoare. Efectul sinergic s-a determinat pe baza dimensiunilor haloului generat după 24 de ore. Concentraţiile antibioticelor adăugate în mediu au fost de 10 μg/ml pentru trimethoprim şi kanamicină şi 50 μg/ml pentru ampicilină.

Procesul de transformare s-a efectuat prin fuziune de protoplaşti în polietilenglicol prin metoda indicată de Chang şi Cohen (1979). Celulele transformate au fost selectate pe medii conţinând kanamicină şi trimethoprim.

Plasmidele pUBUC 18 şi pEC_1, având dimensiunea de 7,23 kb şi respectiv 4,507 kb, au indus caracterul de rezistenţă la antibiotice prin introducerea în celule gazdă de *B. subtilis* ICCF 22a, astfel încât acestea pot fi utilizate la obţinerea vectorilor de clonare recombinanţi pentru *B. subtilis*.

În vederea obţinerii unor vectori de clonare plasmidiali, recombinanţi pentru *B. subtilis*, a fost necesară amplificarea şi izolarea genelor *pro* A şi *pro* B răspunzătoare de creşterea producţiei de proteaze extracelulare la *B. subtilis*.

În scopul selecţionării genei *pro* B şi legării acesteia în vectorului pUBUC 18 s-a procedat la amplificarea secvenţei de nucleotide din genomul unor tulpini de *B. subtilis* producătoare de proteaze. Capacitatea de producere a proteazelor neutre şi alcaline a acestor tulpini s-a verificat pe plăci Petri cu mediu LBCG.

În vederea amplificării genei de interes, s-a procedat la extracţia şi purificarea ADN cromozomal.

Pentru iniţierea reacţiei de polimerizare, s-a studiat secvenţa de nucleotide a genei pro B şi s-au ales pentru amplificare 2 "primeri" cu 30 nucleotide şi respectiv 27 nucleotide, cu următoarea secvenţă:

Primer 1: (5') TAG TCG ACG GTA CCA CGG AAA CCC ATT TGC
Primer 2: (5') ATG GAT CCG CGG TAA ATA ATG GCT GAC.

Tulpinile bacteriene utilizate pentru extracţia ADN cromozomal sunt cuprinse în tabelul 14.7.

Tabelul 14.7

Tulpini bacteriene utilizate pentru extracţia ADN cromozomal

Tulpini	Caracteristici	Proveniență
B.subtilis Marburg (B52)	Sm, Km, Cm, Amp	USAMV-Bucureşti Facultatea de Biotehnologii
B.subtilis ICCF-22	Amp	ICCF-Bucureşti
B.subtilis USAB	Amp, Trim	USAMVB-Timişoara, Facultatea de Zootehnie şi Biotehnologii
B.subtilis 31	Sm	USAMV-Bucureşti Facultatea de Biotehnologii
B.subtilis B.34	Cm, Km	USAMV-Bucureşti Facultatea de Biotehnologii

ADN-cromozomal utilizat la amplificarea genelor *pro* A şi *pro* B s-a izolat şi s-a purificat din tulpinile cuprinse în tabelul 14.7, aplicând metoda tratării cu fenol descrisă de Saito şi Miura.

Fragmentele de ADN conţinând genele *pro* A şi *pro* B au fost izolate şi purificate prin secţionarea gelului de agaroză conţinând produsul după amplificare şi purificat cu ajutorul kit-ului QIAEX DNA.

Produsul amplificat obţinut poate fi utilizat la inserţia genelor *pro* A, *pro* B în plasmide folosite ca vectori de clonare în *B. subtilis*.

14.7. BIOSINTEZA PROTEAZELOR BACTERIENE ÎN SISTEM SUBMERS

Utilizarea pe scară largă a proteazelor microbiene a determinat creşterea progresivă a interesului oamenilor de ştiinţă faţă de aceste enzime. Numeroasele cercetări au condus la obţinerea acestor enzime în stare de puritate avansată, stabilirea parametrilor optimi de activitate şi stabilitate, precizarea mecanismelor lor de acţiune şi, în ultimele decenii, la stabilirea structurii lor.

O serie de proteaze, cu precădere cele de origine bacteriană sau fungică, sunt obţinute şi comercializate ca preparate enzimatice utilizate în diferite sectoare ale industriei alimentare, farmaceutice, la obţinera detergenţilor cu enzime, în scopuri analitice etc. Aria largă de utilizare practică este determinată de avantajele pe care le oferă acest tip de preparate, respectiv viteze ridicate de cataliză, specificitate, acţiune în condiţii de *p*H, temperatură, presiune etc. aproape normale.

Toate acestea şi în special faptul că proteazele microbiene se utilizează în industria detergenţilor enzimatici au determinat producerea acestor enzime în cantităţi industriale, avînd la ora actuală cea mai mare piaţă de desfacere.

La noi în ţară s-a stabilit o tehnologie de obţinere a proteazelor utilizate în compoziţia detergenţilor pornind de la o tulpină selecţionată prin mutageneză, în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti.

Cultivarea tulpinii *Bacillus subtilis ICCF-22a,* selecţionate, s-a realizat în condiţii submerse, în bioreactoare de diferite capacităţi (10–100 l). Productivitatea bioprocesului a fost mărită şi prin alegerea celor mai bune condiţii de cultivare – respectiv mediul de cultură, etapa de dezvoltare, parametrii de biosinteză, atât pentru faza de laborator cât şi în condiţii pilot.

14.7.1. Medii de cultură

Mediile utilizate pentru obținerea preparatelor enzimatice de origine microbiană sunt fie *medii sintetice* – conținând surse standardizate de carbon, azot și săruri minerale – fie *medii naturale* – conținând ca surse de carbon și azot, subproduse ale industriei agroalimentare – șrot de soia, tărâțe de grâu, făină de porumb, extract de porumb, melasă, hidrolizate cu conținut în glucoză. Avantajele utilizării acestor subproduse constau în prețul de cost scăzut, disponibilitatea și compoziția complexă – carbon, azot, vitamine, aminoacizi, minerale. Pornind de la aceste considerente, în biosinteza proteazelor microbiene pot fi utilizate mai multe formule de mediu nutritiv, care sunt prezentate în cele ce urmează.

Pentru cultivarea tulpinilor de *Bacillus subtilis*:

- *mediu cu geloză simplă*:
  - peptonă 1 g %
  - extract de carne 0,3 g %
  - NaCl 0,5 g %
  - agar-agar 2 g %
- *mediu minimal*
  (*Subtilis minimal medium*) (*SMM*)
  - glucoză 0,5 g %
  - hidrolizat de caseină 0,02 g %
  - $(NH_4)_2SO_4$ 0,2 g %
  - K_2HPO_4 1,4 g %
  - KH_2PO_4 0,6 g %
  - citrat de sodiu.$2H_2O$ 0,1 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,02 g %
- *mediu cu lactoză*:
  (*semisintetic*) (*SS*)
  - lactoză 2 g %
  - Bacto-peptonă Difco 1 g %
  - NaCl 0,15 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,015 g %
  - $CaCl_2$ 0,006 g%
  - K_2HPO_4 0,15 g %
  - KH_2PO_4 0,15 g %
  - Na_2SO_4 0,15 g %
  - $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,001 g %

BCU IAȘI - CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

- *mediu cu glucoză* (*G*):
  - glucoză 1 g %
  - amidon solubil 5 g %
  - făină de soia 1 g %
  - $(NH_4)_2HPO_4$ 0,5 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,05 g %
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 1 %* (H1)*
  - hidrolizat acid de mălai 1 g %
  - făină de soia 1 g %
  - $(NH_4)_2HPO_4$ 0,5 g %
  - $MgSO_4.7H_2O$ 0,05 g %
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 2 %* (H2)*
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 3 %* (H3)*
- *mediu cu hidrolizat acid de mălai 4 %* (H4)*
- *mediu cu şrot de soia 1 %* (MS-1):
  - făină de porumb 2 g %
  - şrot de soia 1 g %
  - $(NH_4)_2HPO_4$ 0,5 g %
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g %
- *mediu cu şrot de soia 2 %* (MS-2)**
- *mediu cu şrot de soia 3 %* (MS-3)**

Sterilizarea mediilor menţionate este dependentă de compoziţie; prin urmare, mediile cu glucoză şi hidrolizat acid de mălai se sterilizează timp de 10 min la 105°C, iar celelalte 20 min la 110°C.

Criteriul de selecţie al formulei optime de mediu este, în general, nivelul maxim de activitate enzimatică prezentă în culturile microbiene cultivate pe mediile respective.

De exemplu, pentru tulpina *Bacillus subtilis ICCF-22a,* cele mai bune rezultate s-au obţinut prin cultivare pe mediul nutritiv MS-2, care conţine şrot de soia 2 % (tabelul14.8).

---

* Mediile H2, H3, H4 conţin şi făină de soia, $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4.7H_2O$ în proporţia indicată pentru mediul H1.

** Mediile MS-2 şi MS-3 conţin şi făină de porumb, $(NH_4)_2HPO_4$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ în proporţia indicată pentru mediul MS-1.

BCU IAŞI - UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 14.8

Activitatea proteolitică a tulpinilor *Bacillus subtilis* ICCF 22a şi *Bacillus subtilis* IFO – 3039 – C_6 cultivate pe diferite medii nutritive, în laborator şi pilot

Tulpina	Varianta de mediu nutritiv	Activitatea proteolitică la *p*H 8,5 [UA/l]		Condiţii de cultivare în faza pilot
		Faza laborator	Faza pilot	
	G (cu glucoză)	3,0	–	–
	H_1 (cu hidrolizat de mălai 1%)	0,8	–	–
Bacillus subtilis ICCF 22a	H_2 (cu hidrolizat de mălai 2%)	1,0	2,0	Temperatură: 37°C Agitare 340 rot/min Debit de aer: 1,5 l/min Presiune 0,5 bar Durata: 48 ore
	H_3 (cu hidrolizat de mălai 3%)	1,2	–	–
	H_4 (cu hidrolizat de mălai 4%)	1,8	–	–
	MS-1 (cu şrot de soia 1%)	3,0	–	–
	MS-2 (cu şrot de soia 2%)	4,0	7,0	Temperatură: 37°C Agitare 340 rot/min Debit de aer: 1,5 l/min Presiune 0,5 bar Durata: 48 ore
	MS-3 (cu şrot de soia 3%)	3,2	–	–
Bacillus subtilis IFO –3039- C_6	MS-2 (cu şrot de soia 2%)	1,0	–	–

Prelucrarea culturilor de *Bacillus subtilis* cultivate pe mediile menţionate s-a efectuat prin separarea biomasei bacteriene prin centrifugare 10 min la 4000 rot/min şi reţinerea supernatantului reprezentând lichidul de cultură extracelular în care s-a determinat ulterior activitatea proteolitică.

14.7.2. Parametrii de cultivare

Procedeul de cultivare submers este cel mai mult folosit în biosinteza proteazelor cu tulpini de *B. subtilis*. Acest procedeu necesită instalaţii care permit o amestecare perfectă a componentelor solide, lichide şi gazoase ale mediului de

biosinteză, o alimentare adecvată cu aer, fiind echipate cu aparatură de măsură şi control (AMC).

Alţi factori importanţi pentru procesul de biosinteză enzimatică sunt: fiziologia producătorilor, formula de mediu nutritiv şi condiţiile de cultivare.

Dintre substanţele care intră în compoziţia mediului nutritiv acţiunea cea mai eficace asupra sintezei proteazelor o manifestă glucidele. Acestea pot fi folosite atât sub formă de polizaharide (amidon) cât şi ca monozaharide. Concentraţia amidonului şi a produselor de hidroliză din mediu poate varia de la 0,1 la 15%, în funcţie de specia microorganismului.

În ceea ce priveşte sursa de azot, pentru cultivarea tulpinilor producătoare de proteaze se folosesc curent azotul din proteine şi produsele lor de hidroliză – peptide şi aminoacizi. Astfel, făina de soia, şrotul de soia, extractul de porumb se folosesc în mod curent în producţia de proteaze cu *B. subtilis*. O serie de autori au stabilit că introducerea în mediu a aminoacizilor favorizează dezvoltarea microorganismelor şi induce biosinteza proteazelor. Astfel, efectul cel mai puternic inductiv îl posedă leucina, pe când asparagina reprimă complet biosinteza, iar arginina, serina, prolina induc parţial sinteza enzimei.

Acţiune stimulatoare asupra sintezei proteazelor de către tulpina *B. subtilis* o au şi vitaminele (tiamină, biotină, acid folic, nicotinamidă).

Pe lângă sursele de carbon, azot, aminoacizi, vitamine şi microelementele, cum ar fi Ca, P, Mn, Fe, K, Mg, introduse în mediu sub formă de săruri în diferite concentraţii pot influenţa biosinteza proteazelor. Astfel, calciul joacă rol de tampon şi stabilizează enzimele proteolitice la temperaturi ridicate. Se presupune că ionii de calciu favorizează şi sinteza enzimelor proteolitice alcaline, înlesnesc eliminarea acestora din celule şi joacă un rol important în formarea sporilor.

În afara compoziţiei mediului nutritiv un rol important îl joacă şi condiţiile de cultivare a microorganismelor: *p*H-ul, temperatura, aeraţia şi proporţia materialului de însămânţare. Condiţiile acestea sunt strict specifice fiecărui microorganism, iar studiul lor permite dirijarea biosintezei enzimelor proteolitice.

***p*H-ul mediului.** Poate influenţa procesele metabolice, sinteza şi acumularea diferitelor enzime. Producătorii de proteaze neutre şi alcaline se dezvoltă bine la valori neutre şi slab alcaline de *p*H, apropiate de 7. Astfel, la cultivarea tulpinilor de *Bacillus subtilis*, *p*H-ul mediului în procesul de fermentaţie se menţine la nivelul 6 – 6,5.

Temperatura de cultivare. Aceasta s-a dovedit foarte importantă pentru creşterea şi dezvoltarea microorganismelor şi pentru biosinteza enzimelor. Temperatura favorabilă creşterii s-a dovedit în majoritatea cazurilor optimă şi pentru sinteza enzimelor. Pentru bacteriile mezofile, temperatura variază între 35 şi 40 °C, iar pentru cele termofile între 45 şi 60 °C. Tulpinile de *Bacillus subtilis* sunt mezofile.

Aeraţia. Concentraţia oxigenului dizolvat în mediu este un factor important, influenţând viteza şi nivelul sintezei proteazelor la bacteriile aerobe. Pentru o sinteză maximă a enzimelor proteolitice de către bacterii este nevoie de o aeraţie intensă. Necesarul de oxigen se creşte la începutul sporulării bacililor, din care cauză în această perioadă se măreşte cantitatea de aer admisă în mediu. Regimul optim de aeraţie pentru fiecare microorganism se stabileşte experimental. La mărirea aeraţiei, durata dezvoltării se poate scurta de 1,5 ori. La unele microorganisme sinteza maximă de enzimă are loc la un debit minim de 1,5 l aer/l mediu şi turaţia agitatorului 400 rot/min.

Fungii aparţinând genului *Aspergillus oryzae* sunt cunoscuţi prin capacitatea lor de a produce un amestec de proteaze, fie acide şi neutre, fie neutre şi alcaline, în funcţie de condiţiile de cultivare.

Proteazele produse de fungi sunt atât intracelulare cât şi extracelulare. Microorganismele respective pot fi cultivate atât în culturi de suprafaţă, cât şi în culturi submerse. În ambele cazuri se utilizează, în general, tulpini mutante selecţionate, cu potenţial de biosinteză al proteazelor crescut faţă de tulpinile sălbatice.

Compoziţia mediului de cultură, necesităţile nutriţionale precum şi parametrii de biosinteză se stabilesc pentru fiecare microorganism în parte.

Inducerea sintezei enzimelor proteolitice în culturi de microorganisme este determinată nu numai de compoziţia mediului nutritiv, ci şi de parametrii tehnologiei de cultivare (*p*H-ul mediului, temperatură, conţinutul oxigenului dizolvat în mediu, calitatea şi cantitatea materialului biologic). *p*H-ul mediului de cultură poate schimba direcţia proceslor metabolice, sinteza şi acumularea enzimelor în culturi de microorganisme. Producătorii de proteaze neutre se dezvoltă optim la valori neutre de *p*H, apropiate de 7,0, în timp ce, pentru biosinteza proteazelor alcaline, microorganismele (mai frecvent bacterii) se cultivă la *p*H = 9,0–11,0, în funcţie de particularităţile fiziologice ale tulpinilor. Fungii şi unele levuri care produc proteaze acide se cultivă la *p*H = 3,5–5.

În timpul bioprocesului, *p*H-ul mediului are tendinţa de scădere, motiv pentru care se face tamponarea mediului cu tampon fosfat sau TRIS, iar în condiţii industriale, *p*H-ul mediului se reglează prin adăugare de amoniac sau hidroxid de sodiu (soluţie).

Sinteza proteazelor are loc într-un domeniu îngust de *p*H şi de aceea are importanţă durata menţinerii acestuia la un nivel determinat. Temperatura de cultivare influenţează atât multiplicarea microorganismelor cât şi sinteza enzimatică.

Biosinteza proteazelor neutre şi alcaline în culturi bacteriene de *Bacillus cereus, Bacillus licheniformis* şi *Bacillus subtilis* se realizează prin cultivarea producătorilor la 35...38°C, timp de 48–72 de ore.

Pentru producerea enzimelor proteolitice în culturi submerse de microorganisme se utilizează bioreactoare cu un volum de 20–200 m^3. Procesele aerobe microbiene necesită un continuu transfer al oxigenului dizolvat în mediul de cultură. Problemele concomitente ale transferului de masă şi energie sunt, de obicei, neglijate în fermentatoarele de capacitate mică şi cu densităţi joase ale celulelor microbiene, însă în procesele de microbiologie industrială care utilizează bioreactoare, cu volumele menţionate anterior, şi cu densităţi mari de celule, transferul de oxigen trebuie luat în consideraţie. Productivitatea enzimatică cea mai mare posibilă se obţine într-un bioreactor, la o capacitate maximă de transport de oxigen, aceasta fiind reflectată prin concentraţii mici ale oxigenului dizolvat în timpul fermentaţiei.

În bioreactor agitarea şi injectarea aerului din compresor sunt utilizate pentru a amesteca conţinutul din vas şi pentru transferul de gaze.

Calitatea şi cantitatea inoculului au un rol important în obţinerea unor metaboliţi cu viteze şi randamente mari de biosinteză. Starea fiziologică a microorganismelor ce formează inoculul ca şi cantitatea acestuia influenţează productivitatea enzimatică, fiind astfel necesară utilizarea unui inocul standardizat.

În cazul bacteriilor din genul *Bacillus*,inoculul este format fie din celule tinere în fază logaritmică de creştere (12–16 ore de incubare), care posedă un nivel ridicat de ADN (inoculul "vegetativ") fie din spori (inoculul "sporifer"). Celulele vegetative bacteriene folosite ca inocul produc de patru ori mai multă protează decât materialul sporulat. Există valori limită de vârstă şi număr de celule care pot fi utilizate ca inocul la însămânţarea mediilor de cultură pentru a produce enzime proteolitice cu activităţi mari. La depăşirea acestor limite se acumulează biomasă multă într-un timp scurt, dar neproductivă. Cantitatea de inocul în cazul tulpinilor de *Bacillus subtilis* are influenţă asupra stadiilor ulterioare ale culturii, determinând diferite stări fiziologice ale celulelor, funcţie de care variază capacitatea de biosinteză a proteazei. Masa minimă de inocul care permite dezvoltarea culturii bacteriene depinde însă de compoziţia substratului. Utilizarea unui inocul "mic" duce la prelungirea fazei de *lag*, în ciuda prezenţei celulelor viabile, făcând ineficient bioprocesul. În general, masa de inocul pentru biosinteza proteazelor cu tulpini de *Bacillus subtilis* este de maximum 5% faţă de mediul de cultură, cu aproximativ 10^5 cel/ml.

Unii autori recomandă introducerea în trepte a inoculului şi anume: iniţial –$1x10^5$ cel/ml, iar după 10 ore de cultivare se mai adaugă 2 ml % – cultură de 16 ore. Prin inocularea în trepte se scurtează durata cultivării cu aproximativ 5 ore, iar activitatea proteolitică creşte cu 50%.

Biosinteza proteazelor neutre şi alcaline este realizată de formele "R" (rough = rugoase) de colonii de *Bacillus subtilis*, care sporulează intens chiar pe

medii sintetice, minimale; formele "S" (smouth = netede), care nu sporulează nici pe medii complexe, sunt neproductive.

Atunci când se utilizează un inocul "sporifer" al unor tulpini din genul *Bacillus*, gradul de sporulare trebuie să fie de 90–95%. Pentru inducerea sporulării se folosesc medii de cultură speciale, în general solide, în funcție de microorganism.

Un procedeu frecvent folosit pentru sporii bacterieni este acela de a-i supune unui şoc termic subletal, anterior inoculării. Prin acest tratament, gradul de uniformitate şi reproductibilitate al inoculului este mult mai ridicat şi, în majoritatea cazurilor, durata fazei de germinare se scurtează, iar procentul sporilor care germinează creşte.

În literatura de specialitate sunt publicate puține detalii referitoare la procesul industrial de obținere a proteazelor din *Bacillus*.

Aunstrup şi colaboratorii oferă detalii sumare privind desfăşurarea procesului de biosinteză a proteazelor într-un bioreactor pilot de 0,55 m^3: temperatura de cultivare a fost de 34°C, debitul de aer 0,7–0,9 l/l mediu/min, durata fermentației 2–5 zile, depinzând de tulpina utilizată.

Markkanen şi Bailey au arătat că tulpinile de *Bacillus subtilis* cultivate în bioreactoare de 6 şi 10 l produc maximum de proteaze la un debit de aer de 0,7 l/l mediu/min; activitatea protează a fost optimă când concentrația oxigenului dizolvat a fost menținută la o saturație de 50%. Coeficientul de transfer de oxigen ($K_L \cdot a$) a fost, în cazul unei productivități maxime de proteaze, de 237 h^{-1}.

14.7.3. Dinamica biosintezei proteazelor neutre cu tulpini de *Bacillus subtilis*

În general, tulpinile de *Bacillus subtilis*, producătoare de enzime, prin cultivare în sistem submers biosintetizează şi elimină în mediul de cultură un complex enzimatic conținând atât proteaze (neutre şi alcaline) cât şi amilaze (în special α-amilază), în funcție de mediul de cultură utilizat precum şi de parametrii de biosinteză stabiliți. Tulpinile care au fost selecționate prin mutageneză în scopul producerii unei anumite enzime biosintetizează cu preponderență acea enzimă pentru care a fost selecționată, nefiind însă suprimată complet biosinteza celorlalte enzime. Tulpinile care au suferit modificări genetice produc, de asemenea, în cantitate mare enzima pentru care s-a efectuat modificarea respectivă.

La producerea de protează în cadrul genului *Bacillus*, există o strânsă corelație între ciclul de dezvoltare al celulelor şi starea fiziologică a acestora. Astfel, biosinteza şi eliberarea proteazei în mediul de cultură are loc către sfârşitul fazei de creştere logaritmică şi este însoțită de sporulare. Protează neutră se

formează în faza de creştere logaritmică, iar proteaza alcalină în perioada de sporulare. S-a observat că producerea de proteaze este însoţită de creşterea bruscă a *p*H-ului mediului de cultură (fig. 14.8).

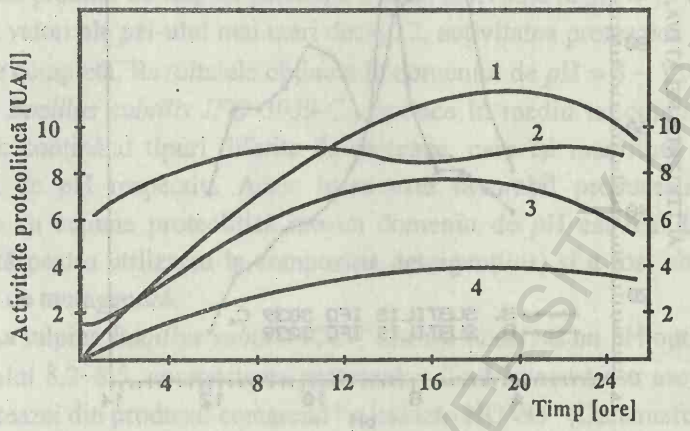


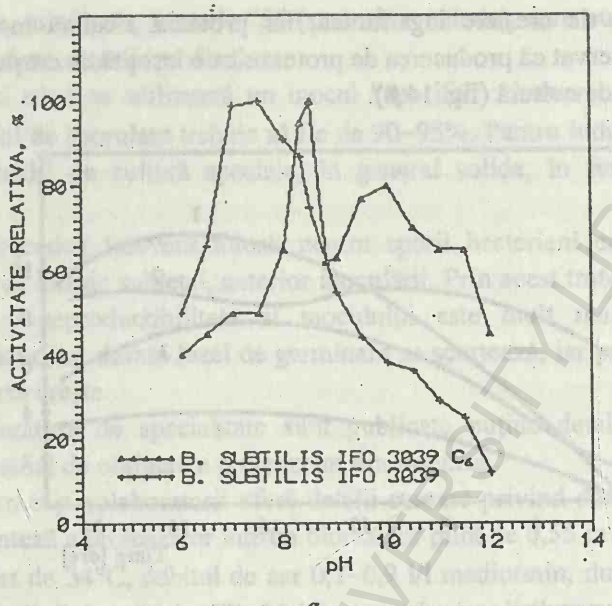
Fig. 14.8. Dinamica acumulării enzimelor proteolitice în culturi submerse de *Bacillus subtilis*: *1* – proteaze neutre; *2* – *p*H-ul mediului de fermentaţie; *3* – biomasă; *4* – proteaze alcaline.

14.7.4. Caracterizarea biochimică a proteazelor extracelulare produse cu tulpini de *Bacillus subtilis*

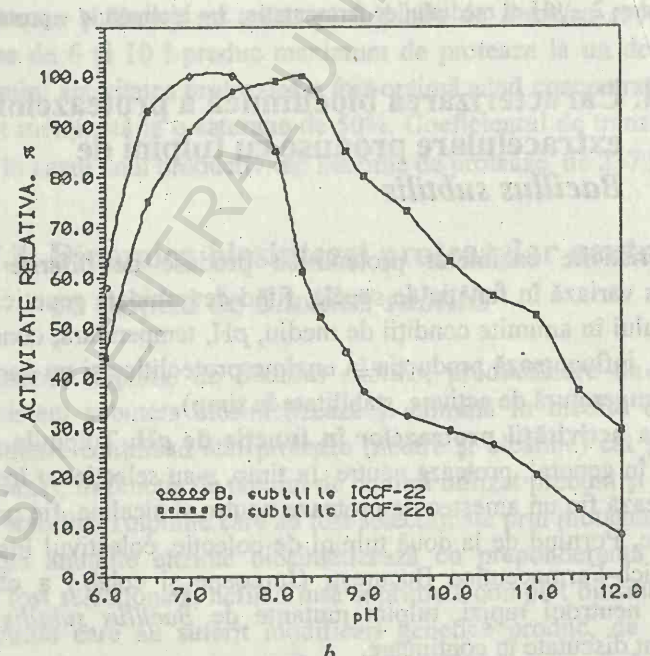
Caracteristicile enzimelor proteolitice produse de diferite tulpini de *Bacillus subtilis* variază în funcţie de specie, fiind determinate genetic. Cultivarea microorganismului în anumite condiţii de mediu, *p*H, temperatură, concentraţie de oxigen dizolvat, influenţează producţia în enzime proteolitice şi nu caracteristicile acestora (*p*H, temperatură de acţiune, stabilitate în timp).

Variaţia activităţii proteazelor în funcţie de *p*H. Tulpinile de *Bacillus subtilis* produc, în general, proteaze neutre. În timp, s-au selecţionat însă şi tulpini care biosintetizează fie un amestec de proteaze neutre şi alcaline, fie preponderent proteaze alcaline. Pornind de la două tulpini de colecţie, colectivul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti (Jurcoane şi colab.) a obţinut, prin mutageneză cu neutroni rapizi, tulpini mutante de *Bacillus subtilis,* ale căror caracteristici sunt discutate în continuare.

Din figura 14.9, *a* şi *b*, se observă că tulpinile parentale *Bacillus subtilis IFO 3039* şi *Bacillus subtilis ICCF 22* sunt producătoare de proteaze în zona de *p*H neutru cu maxime la *p*H = 7,5 şi respectiv 7, în timp ce tulpinile selecţionate *Bacillus subtilis IFO 3039-C*$_6$ şi *Bacillus subtilis ICCF 22a* produc proteaze în zona de *p*H alcalin, cu valori maxime situate în intervalul 8–11.



a



b

Fig. 14.9. Efectul variațiilor de *p*H asupra activității proteazelor extracelulare produse de tulpinile:

a – Bacillus subtilis IFO 3039 și *Bacillus subtilis IFO 3039-C*$_6$;

b – Bacillus subtilis ICCF 22 și *Bacillus subtilis ICCF 22a*.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* s-a observat însă existența a două maxime de activitate protează, la *p*H = 8,5 și, respectiv, *p*H = 10. La *p*H = 11, enzimele produse de această tulpină mutantă prezintă 60 % din activitatea maximă, față de cele produse de tulpina parentală a cărei activitate la *p*H = 11 este de numai 20 %. La valori ale *p*H-ului mai mari decât 12, activitatea protează scade până la inactivare completă. Rezultatele obținute în domeniul de *p*H = 8–11 se explică prin faptul că *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* produce în mediu un complex enzimatic proteolitic conținând tipuri diferite de proteaze, care își manifestă activitatea în domeniul de *p*H respectiv. Acest lucru este favorabil producerii de preparat enzimatic cu acțiune proteolitică într-un domeniu de *p*H cât mai larg (trăsătură importantă pentru utilizarea în compoziția detergenților) și a fost obținut în urma lucrărilor de mutageneză.

La tulpina *Bacillus subtilis ICCF 22a* s-a observat un *p*H optim de acțiune în intervalul 8,2–8,5, comportarea proteazelor fiind în acest caz asemănătoare cu cea a proteazei din produsul comercial "Alcalază- NOVO" (Danemarca).

Deși tulpina *Bacillus subtilis IFO 3030-C_6* prezintă în intervalul de *p*H alcalin două maxime de activitate – corespunzând valorilor de *p*H 8,5 și 10, activitatea enzimatică proteolitică este inferioară celei obținute cu tulpina de *Bacillus subtilis ICCF 22a.* Astfel, la un *p*H = 8,5 pentru *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* s-a obținut o activitate enzimatică de 1 UA/l față de 4 UA/l pentru tulpina de *Bacillus subtilis ICCF 22a.* Din acest motiv, pentru obținerea unui preparat enzimatic proteolitic activ în domeniul alcalin se recomandă tulpina de *Bacillus subtilis ICCF 22a.*

Temperatura optimă de activitate a proteazelor extracelulare produse de tulpinile de *Bacillus subtilis*. În general, proteazele extracelulare produse cu tulpini de *Bacillus subtilis* au activitate într-un domeniu larg de temperatură (20...60°C), nefiind însă cunoscute ca enzime termorezistente. Exemplificăm prin rezultatele obținute de colectivul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București. Efectul acestui parametru s-a urmărit prin determinarea activității enzimatice proteolitice, la diferite temperaturi în intervalul 25...80°C și la *p*H = 8,5. Din figura 14.10 se observă că activitatea proteazelor extracelulare produse de tulpina mutantă de *Bacillus subtilis IFO 3039-C_6* este maximă la temperatura de 65°C, iar a celor din *Bacillus subtilis ICCF 22a* la 60°C. În acest din urmă caz, la temperatura de 70°C activitatea proteazelor este de circa 63% din activitatea maximă manifestată la 60°C. Comportamentul acestor proteaze față de diferite valori de temperatură este asemănătoare cu cel al Alcalazei NOVO.

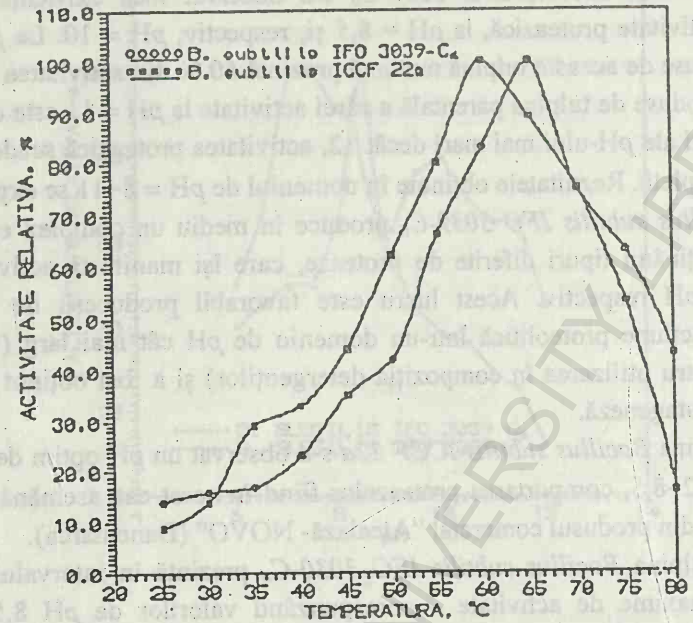


Fig. 14.10. Efectul temperaturii asupra activității proteazice extracelulare produse de tulpinile: *Bacillus subtilis IFO 3039-C6* și *Bacillus subtilis ICCF 22a.*

Stabilitatea în timp a proteazelor neutre și alcaline izolate din mediile fermentate de *Bacillus subtilis*. Enzimele proteolitice din tulpini de *Bacillus subtilis* au, în general. o stabilitate redusă în timp și de aceea se impun condiții speciale de păstrare (la temperaturi scăzute, sau condiționate într-o formă specială cu agenți protectori).

Efectul temperaturii asupra stabilității activității proteazelor s-a urmărit prin menținerea lichidului de cultură obținut cu tulpina *Bacillus subtilis ICCF 22a*, timp de 60 min la diferite valori termice cuprinse între 25 și 70°C, ulterior determinându-se activitatea reziduală în condițiile metodei de analiză (temperatură 37°C, *p*H = 8,5, substrat de cazeină). Rezultatele obținute au relevat că menținerea extractului la temperaturi cuprinse în acest interval, timp de 60 de min, conduce la scăderi ale activității enzimatice, la 60°C regăsindu-se 53% din activitatea proteolitică inițială (tabelul 14.9).

În scopul examinării stabilității față de *p*H, extractul enzimatic a fost menținut la diferite valori de *p*H cuprinse în intervalul 6–12, timp de 18 ore, la 25°C, după care au fost determinate activitățile reziduale. Datele obținute au evidențiat o menținere a activității enzimatice de 81–93% pentru domeniul de *p*H = 6,0–9,0 (tabelul 14.10).

Tabelul 14.9

Efectul temperaturii asupra stabilității activităților enzimatice ale proteazelor din *Bacillus subtilis ICCF 22a*

Temperatura °C	Activitate enzimatică după 60 min, UA/l	Activitatea reziduală relativă, %
22	4,38	99
30	4,20	95
37	4,40	100
40	3,80	86
50	3,50	79
60	2,32	53
70	1,08	24

Tabelul 14.10

Influența valorilor de *p*H asupra stabilității proteazelor alcaline produse de *Bacillus subtilis ICCF 22a*

*p*H-ul	Activitatea enzimatică după 18 ore, UA/l	Activitatea relativă*, %
6,0	5,2	88
7,0	5,4	91
8,0	5,5	93
9,0	4,8	81
10,0	4,2	71
11,0	3,5	60
12,0	2,2	37

* Activitatea inițială a enzimei față de care s-a calculat activitatea relativă a fost de 5,8 UA/l, determinată la *p*H = 8,5, în aceleași condiții.

14.8. BIOSINTEZA PROTEAZELOR FUNGICE

14.8.1. Medii de cultură

Biosinteza enzimelor proteolitice cu ajutorul fungilor se realizează prin cultivarea tulpinilor selecționate pe medii de cultură semisintetice sau naturale, care conțin, de regulă, o sursă de carbon, o sursă de azot, factori de creștere și microelemente. Sursa de carbon (glucidele) din compoziția mediilor de cultură reprezintă sursa de energie și participă activ la metabolismul celulei. Concentrația sursei de carbon în mediul de cultură poate varia între 1 și 15 %, în funcție de microorganismul utilizat. Sursa de carbon este reprezentată, de obicei, de: glucoză: lactoză: amidon.

Pentru cultivarea fungilor de *Aspergillus oryzae* se pot utiliza următoarele formule de mediu nutritiv:

- mediu Czapek-Dox:
  - glucoză 3 g %
  - $NaNO_3$ 0,3 g %
  - K_2HPO_4 0,1 g %
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,05 g %
  - KCl 0,05 g %
  - $FeSO_4$ 0,001 g %
  - agar-agar 1,3 g %
- mediu cu extract de drojdie (yeast – peptone – glucose) (YPG):
  - extract de drojdie 0,5 g %
  - peptonă 0,5 g %
  - glucoză 2 g %
  - agar-agar 2 g %
- mediu minimal pentru genul *Aspergillus* (MAM):
  - glucoză 1 g %
  - $NaNO_3$ 6 g %
  - KH_2PO_4 1,52 g %
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,52 g %
  - KCl 0,52 g %
  - $FeSO_4$ 0,001 g %
  - $ZnSO_4$ 0,001 g %
  - agar-agar 1,5 g %
- mediu cu lactoză (M):
  (mediu martor)
  - făină de soia 2,5 g %
  - lactoză 1,5 g %
  - KH_2PO_4 0,4 m
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %
- mediu cu glucoză (M1):
  - făină de soia 2,5 g %
  - glucoză 1 g %
  - KH_2PO_4 0,4 M
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %
- mediu cu amidon (M2):
  - făină de soia 2,5 g %
  - amidon solubil 2 g %
  - KH_2PO_4 0,4 m
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %
- mediu cu melasă (M3):
  - făină de soia 2,5 g %
  - melasă 10 g %
  - KH_2PO_4 0,4 m
  - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,012 g %

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– mediu cu extract de porumb (M4):

făină de soia	2,5 g %
amidon solubil	2 g %
extract de porumb	0,5 g %
KH_2PO_4	0,2 M
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,012 g %

Mediile solide (agarizate) Czapek, YPG şi respectiv MAM se sterilizează 10 min la 105°C, în timp ce mediile lichide menţionate se sterilizează 20 min la 135°C, cu o prehidroliză termică de 60 min la 100°C. Pentru mediile cu lactoză (M1), sterilizarea se realizează la 105°C, timp de 10 min.

14.8.2. Condiţii de cultivare

Fungii filamentoşi din genul *Aspergillus* dezvoltă o biomasă specifică în care se acumulează enzime proteolitice la diferite valori ale *p*H-ului. Astfel, sinteza enzimatică în culturi de *Aspergillus sojae, Aspergillus oryzae şi Aspergillus niger* se realizează la *p*H = 5,0–5,5, în timp ce *Aspergillus terreus* sintetizează proteaze la *p*H = 6,0–6,5. Acumularea enzimelor proteolitice în mediul de cultură este acompaniată de creşterea bruscă a *p*H-ului, indicând astfel intrarea în faza staţionară a bioprocesului. Pentru fungii producători de enzime proteolitice temperatura variază între 26 şi 32 °C.

În cultivarea submersă a fungilor pentru producerea enzimelor proteolitice este importantă stabilirea unei corelaţii optime între agitarea şi aerarea mediului, astfel încât să nu se producă fragmentarea hifelor, dar în acelaşi timp să se poată asigura un conţinut optim de oxigen în mediu necesar sintezei enzimatice.

Cantitatea şi calitatea inoculului sunt alţi parametri care influenţează procesul de biosinteză a proteazelor la fungi. În procesele industriale se folosesc 1–2 trepte de inoculare pornind de la inoculul sporifer. Pentru relizarea inoculului sporifer sunt necesare două faze:

– reactivarea microorganismului prin repicare din cultura stoc, purificarea şi testarea capacităţii de producţie;

– inocularea fungului pe un mediu de sporulare adecvat (de obicei must de malţ agarizat).

În următoarea treaptă de inoculare, celulele vegetative pot fi obţinute prin cultivarea sporilor pe un mediu lichid a cărui compoziţie se stabileşte la nivel de laborator (mediu de inocul laborator). Inoculul vegetativ utilizat în biosinteza pilot sau industrială se obţine prin prelevarea celulelor vegetative dintr-o fază timpurie de creştere, de obicei din faza exponenţială.

Cantitatea de inocul influenţează mărimea şi forma aglomerărilor miceliene, fenomenul de dimorfism precum şi randamentul în enzime proteolitice. Astfel, în cazul fungilor de *Aspergillus oryzae*, culturile amorsate cu cantităţi reduse de inocul se caracterizează printr-o viteză redusă de dezvoltare şi, în

consecință, producții mici în enzime. Dimpotrivă, cantități maxime de miceliu conduc la un metabolism ineficient, deoarece este metabolizată o cantitate mare de glucide și concomitent are loc eliminarea în mediu a unei cantități mari de compuși cu azot organic.

14.8.3. Dinamica biosintezei enzimelor proteolitice în culturi submerse de *Aspergillus oryzae*

Biosinteza enzimelor proteolitice cu tulpini de *Aspergillus oryzae* a fost studiată în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București, secția Biosinteze, în perioada 1993–1997, finalizându-se cu relizarea unor produse enzimatice de interes farmaceutic (Jurcoane și colab., 1995). Astfel, în ceea ce privește parametrii optimi de cultivare a tulpinii *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* în condiții de micropilot, rezultatele obținute în experimentele efectuate pe mediul de cultură M4, pe bază de amidon și făină de soia (subcap. 14.8.1) au indicat o temperatură de 30°C, agitare variabilă – 300, 400, 600 și 800 rot/min, corespunzând la 18, 24, 30, 36 și, respectiv, 40 ore de fermentație, debit de aer: 0,8 l/l mediu/min.

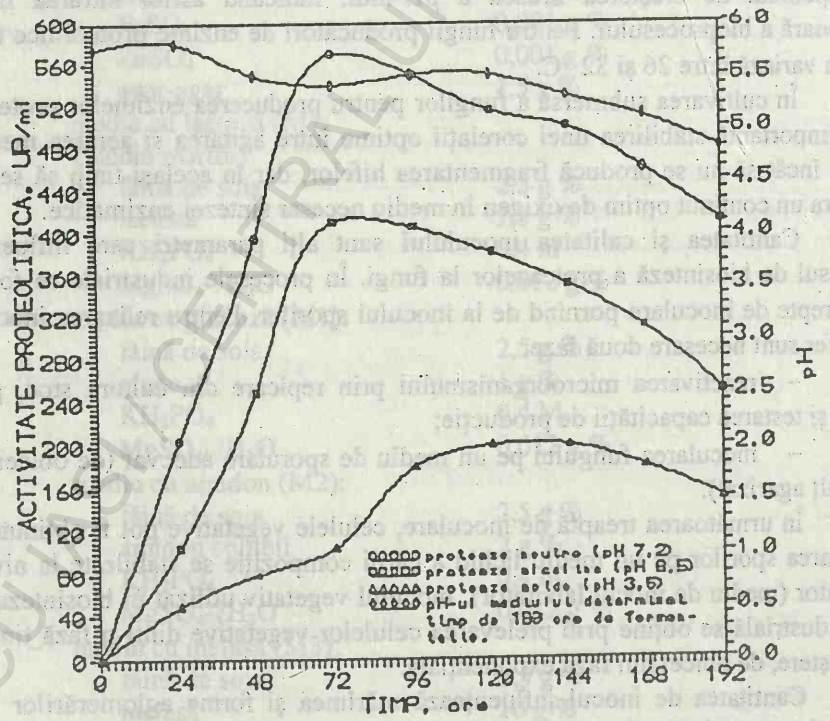


Fig.14.11. Profilul activității proteolitice în cultura de *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*.

Profilul activității enzimatice a proteazelor extracelulare biosintetizate de tulpina *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*, cultivată timp de 168 de ore în aceste condiții, se poate urmări în fig. 14.11. După cum se observă, biosinteza proteazelor neutre este maximă după 40–48 de ore de cultivare, a proteazelor alcaline între 48–60 de ore, iar a celor acide după 60 de ore. De remarcat că există o interdependență între natura proteazelor biosintetizate pe parcursul fermentației și profilul de *p*H al mediului. Ținând cont de acest fapt, pentru obținerea și purificarea proteazelor neutre, fermentația a fost întreruptă în momentul în care valoarea *p*H-ului a scăzut la 5,5 (de obicei după 48 de ore de cultivare).

În acest caz nivelul de activitate proteazică în mediul de cultură s-a situat între 350 și 550 UP/ml, comparabil cu cel indicat în literatura de specialitate pentru tulpini de *Aspergillus oryzae* bune producătoare de proteaze neutre.

14.8.4. Procedee de izolare și purificare a enzimelor proteolitice fungice

În cazul proteazelor, metodele electroforetice sunt utilizate pe scară largă atât în scopuri analitice cât și preparative. Cel mai des utilizate sunt: electroforeza în gel de poliacrilamidă (PAGE), gelurile fiind realizate prin inducerea polimerizării acrilamidei și N,N'-metilenbisacrilamidei într-un tampon ales, și electroforeza în gel de poliacrilamidă în prezența dodecilsulfatului de sodiu (SDS – PAGE). În acest din urmă caz, detergentul SDS denaturează proteinele formând complexe SDS/proteină care diferă numai prin masa lor moleculară, separarea bazându-se atât pe diferența de încărcare electrică a moleculelor cât și pe diferența de masă moleculară (gel-filtrare).

Literatura de specialitate indică utilizarea metodei SDS - PAGE la caracterizarea proteazelor microbiene după o serie de purificări anterioare, prin demonstrarea omogenității electroforetice a preparatelor respective. Astfel, o protează intracelulară din *Pseudomonas carboxyhidrogena* s-a purificat până la o omogenitate de peste 95% în 5 trepte, determinându-se greutatea moleculară prin SDS - PAGE, găsindu-se două subunități de 70 000 și respectiv 56 000 Da. În alt caz, purificarea și caracterizarea unei proteaze alcaline din microorganismul alcalofil *Thermoactinomyces sp. HS 682* s-a efectuat doar printr-o tehnică electroforetică utilizând două coloane cromatografice Butyl - Toyopearl 650 M și Toyopearl 650 S.

Enzima purificată are o masă moleculară aparentă de 25 000, determinată prin gel-filtrare de Sephadex G-75 și SDS - PAGE și un punct izoelectric la *p*H=11.

Metodele electroforetice s-au utilizat, de asemenea, de către un colectiv de cercetători japonezi în clonarea și caracterizarea unei proteaze alcaline din *Bacillus sp. AH 101.* Clonarea s-a efectuat pe *Escherichía coli* și proteaza s-a purificat de 70 de ori cu un randament de 10%. Greutatea moleculară s-a estimat la 36 800, prin SDS - PAGE.

Purificarea şi proprietăţile proteinazei acide din genul *Monoscus sp. No 3404* s-au efectuat prin gelfiltrare şi SDS poliacrilamid – electroforeză. Proteaza alcalină secretată de către *Pseudomonas maltrophylis 27* s-a purificat până la omogenitate prin fracţionare cu $(NH_4)_2SO_4$ cromatografie pe Sephadex G-200 şi Sephadex G-75 şi electroforeză preparativă pe poliacrilamidă. Masa sa moleculară a fost 76 000. Proteaza conţine 2 subunităţi ca mase moleculare diferite: 31 000 şi 44 000 Da.

Punerea în evidenţă şi caracterizarea proteazelor extracelulare din *Bacillus subtilis* a proteazelor alcaline termostabile din *Bacillus SD 521*, a proteazelor alcaline din fungul *Asper gillus flavus* şi a proteazelor neutre din celulele de *Geotrechum lactis* s-a efectuat, de asemenea, prin metode electroforetice.

Separarea biomasei. Cercetările de izolare a enzimelor proteolitice din mediul de fermentaţie au ca scop obţinerea unor preparate enzimatice utilizabile în medicină (de exemplu, la curăţirea plăgilor necrotice şi la eliminarea sfacelelor înainte de aplicarea cicatrizantelor locale şi ca medicamente enzimatice digestive).

Tulpinile din genul *Aspergillus* produc atât protează intracelulară cât şi extracelulară. Din determinările de activitate proteolitică efectuate în lichidul de cultură şi în miceliul de *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* (tabelul 14.11) s-a constatat că proteazele extracelulare sunt preponderente, astfel încât din mediul fermentat interesează lichidul obţinut după separarea biomasei fungice.

Tabelul 14.11

Biosinteza proteazelor intra- şi extracelulare cu tulpina *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Natura proteazelor biosintetizate	Volumul, ml	Activitatea proteolitică, UP/ml	Activitatea proteolitică totală, UP
Intracelular: extract de miceliu (raport de extracţie 1/3)	60	200	12 000
Extracelular: lichid de cultură	84	500	42 000

Separarea biomasei de *Aspergillus oryzae* nu prezintă dificultăţi deosebite, dată fiind structura filamentoasă a miceliului. Din tabelul 14.12 se poate observa că viteza de filtrare a acesteia la vacuum este mare chiar fără adaos de adjuvant de filtrare (300 $l/m^2 \cdot h$).

Tabelul 14.12

Influenţa procedeului de separare a biomasei bacteriene asupra vitezei de filtrare
Volum mediu: 904 ml, $S = 113$ cm^2

Procedeul de separare	Timpul, min	Viteza de filtrare, l/m^2h
Filtrare, cădere liberă	120	40
Filtrare, vacuum	16	300
Filtrare, vacuum, adaos 0,5% celită	15	320

Concentrarea prin ultrafiltrare. În cazul proteazelor, metoda ultrafiltrării este folosită pentru concentrarea şi purificarea acestora din mediul de cultură perfect limpede rezultat în urma operaţiei de filtrare.

Astfel, utilizând o membrană ACV 300 – limita de excludere 13 kDa, s-a reuşit concentrarea unei proteaze alcaline din extractul brut obţinut de la o cultură de *Aspergillus soyae*. Adeseori se apelează la procedeul de ultrafiltrare în trepte. În acest sens, folosind o membrană de tip TS-3000 şi o membrană TS 10, a fost realizată purificarea şi concentrarea unei proteaze neutre din cultura de *Bacillus subtilis*.

De menţionat că valori ridicate ale fluxului de filtrat şi respectiv ale randamentului în produs s-au obţinut cu membrane polisulfonice şi cu floculanţi polimerici cationici şi/sau anionici.

Ultrafiltrarea prezintă avantajul efectuării operaţiei de concentrare la temperaturi scăzute, în paralel cu purificarea soluţiei de compuşii chimici cu mase moleculare mai mici decît enzima de interes, nemaifiind necesară dializa probei respective.

Astfel, în vederea concentrării soluţiilor native de proteaze rezultate în urma filtrării biomasei fungice, au fost utilizate prin comparaţie metoda clasică de concentrare sub vid (pe un rotavapor tip Buchi) şi metoda concentrării prin ultrafiltrare pe membrane Millipore tip polisulfonic PTGC 000 05/NMWL 10 kDa. Aplicarea primei metode a condus la obţinerea unor randamente scăzute de recuperare a activităţii enzimatice, datorită denaturării termice a enzimelor, operaţia efectuându-se la temperaturi cuprinse între 40 şi 45°C. Din tabelul 14.13 se observă o creştere a activităţii enzimatice o dată cu scăderea temperaturii.

Tabelul 14.13

Influenţa temperaturii de concentrare asupra activităţii proteazice din *Aspergillus oryzae*

Temperatura °C	Iniţial		Final		Randament (în activitate) %
	Volum, ml	Activitate, UP/ml	Volum, ml	Activitate, UP/ml	
45	250	371	75	633	51,18
43	480	515	110	1520	67,63
41	1080	615	400	1122	69,66
40	750	326	150	1303	79,63

Aplicarea metodei de concentrare tip ultrafiltrare a permis remedierea acestui inconvenient, realizându-se totodată o purificare suplimentară – de cca 2,5 ori – a proteazelor microbiene. Studiile de purificare prin ultrafiltrare au fost efectuate prin operaţii repetate de diafiltrare. Procedeul aplicat a fost discontinuu, cu concentrări şi diluări repetate, până la volumul iniţial, urmate de concentrarea finală. Rezultatele acestor studii sunt inserate în tabelul 14.14.

Tabelul 14.14

Etapele purificării prin ultrafiltrare și diafiltrare a proteazelor microbiene produse de *Aspergillus oryzae 20-9*

Etapa de purificare	Volumul ml	Conținutul în proteaze mg/ml	Activitatea enzimatică		Activitatea specifică	Factorul de purificare (FP)*	Randamentul pe fază %
			UP/ml	totală UP			
Soluția inițială I	850	7,10	507	$0,43 \cdot 10^6$	71,4		
Concentrat I	200	14	1593	$0,31 \cdot 10^6$	113,78	1,59	73,92
Soluția inițială II	850		371	$0,31 \cdot 10^6$			
Concentrat II	210	6,90	1158	$0,24 \cdot 10^6$	167,82	2,35	77,11
Soluția inițială I	5500	5,80	398	$2,18 \cdot 10^6$	68,62		
Concentrat I	1000	16,20	1520	$1,52 \cdot 10^6$	93,82	1,36	69,42
Soluția inițială II	2800		543	$1,52 \cdot 10^6$			
Concentrat II	200	34,50	7240	$1,44 \cdot 10^6$	209,85	3,05	95,23
Soluția inițială I	1265	7,40	1140	$1,44 \cdot 10^6$	154		
Concentrat I	305	15,60	4100	$1,25 \cdot 10^6$	2,63	1,7	86,71
Soluția inițială II	1000		1250	$1,25 \cdot 10^6$			
Concentrat II	280	13	4300	$1,20 \cdot 10^6$	330	2,1	96,28
Soluția inițială III	1000		1204	$1,20 \cdot 10^6$			
Concentrat III	355	9,20	3240	$1,15 \cdot 10^6$	352,17	2,3	95,53
Soluția inițială IV	1200		960	$1,15 \cdot 10^6$			
Concentrat IV	260	9,60	3840	$0,99 \cdot 10^6$	400	2,6	86,66
Soluția inițială I	1000	8,75	1320	$1,32 \cdot 10^6$	150,8		
Concentrat I	170	32,5	7600	$1,29 \cdot 10^6$	233,84	1,55	97,87
Soluția inițială II	800		1620	$1,29 \cdot 10^6$			
Concentrat II	260	14,5	4200	$1,09 \cdot 10^6$	289,65	1,92	84,25
Soluția inițială III	850		1280	$1,09 \cdot 10^6$			
Concentrat III	150	20	6800	$1,02 \cdot 10^6$	340	2,25	93,75

*FP calculat după fiecare fază de diafiltrare s-a raportat la soluția inițială supusă purificării.

În scopul stabilirii condițiilor optime de lucru la faza de ultrafiltrare a proteazelor microbiene din *Aspergillus oryzae*, s-au efectuat determinări ale fluxului de filtrat în funcție de presiunea trasmembranară aplicată în cursul operației. Astfel, în fig. 14.12 sunt redate variațiile fluxului de filtrat, funcție de presiunea transmembranară pentru soluții native obținute din două experiențe de biosinteză (S_7, S_8). Pentru ambele soluții se constată instalarea fluxului limită la presiuni de 90–120 kPa, cu valori cuprinse între 10 și 15 l/m^2·h. Se verifică astfel modelul fluxului liniar datorat fenomenului de gel-polarizare. Permeabilitatea pentru apă a membranelor scade ca urmare a colmatării, efectul fiind marcant la valori superioare ale presiunii de lucru.

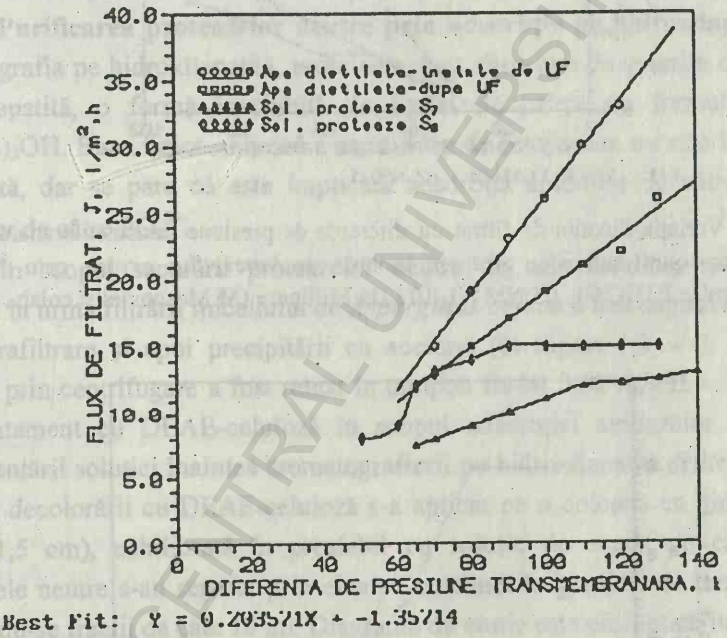


Fig. 14.12. Variațiile fluxului de filtrat în funcție de diferența de presiune transmembranară la ultrafiltrarea unor soluții native de proteaze produse de *Aspergillus oryzae* prin membrane polisulfonice PTGC-Millipore (M.Moscovici și colab., 1995).

Experiențele ulterioare s-au efectuat la o presiune transmembranară corespunzătoare aprecierii de valoarea fluxului limită (85–90 kPa).

În figura 14.13 se prezintă variația fluxului de filtrat funcție de diferența de presiune transmembranară la ultrafiltrarea unei soluții native de proteaze obținută la nivel micropilot ($S_3 - M_p$). Se observă că valoarea maximă a fluxului de filtrat de 4–6 l/m^2·h este atinsă la 70–90 kPa, când apare tendința de flux limitat caracteristic polarizării de concentrație.

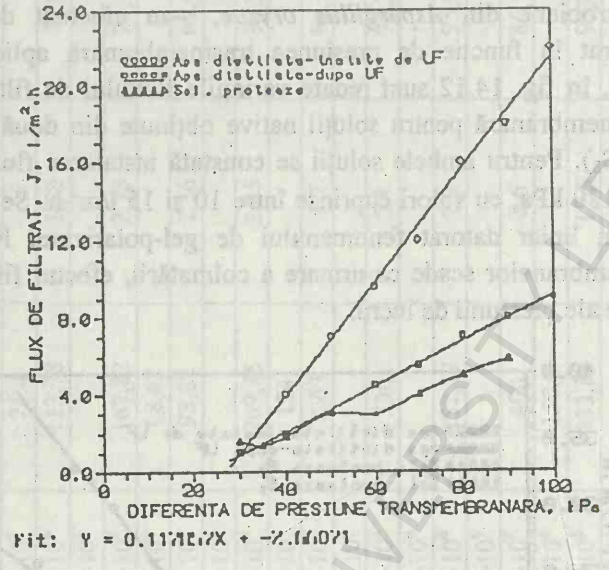


Fig. 14.13. Variația fluxului de filtrat cu diferența de presiune transmembranară la ultrafiltrarea unor soluții native de proteaze produse de *Aspergillus oryzae*, prin membrane polisulfonice PTGC 000 05/NMWL 10 kDa-Millipore (M.Moscovici şi colab., 1995).

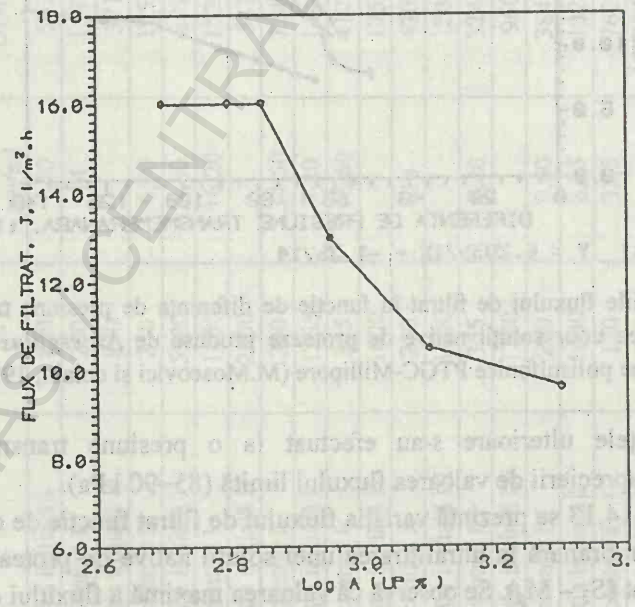


Fig. 14.14. Fluxul de filtrat, funcție de activitatea soluției native de proteaze produse de *Aspergillus oryzae*, separate prin ultrafiltrare pe membrane polisulfonice PTGC-Millipore (M.Moscovici şi colab., 1995).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Figura 14.14 prezintă fluxul de filtrat, funcție de (*log*) concentrației (activitatea) soluției. În prima porțiune a curbei se constată aspectul caracteristic modelului gel-polarizării cu apariția concentrației critice de formare a gelului corespunzând ariei valorii de 1300 UP/ml. În porțiunea descrescătoare, variația fluxului se abate de la modelul tipic al gelului de concentrație constantă. Fluxul de filtrat scade, curba căpătând un aspect asimptotic, ceea ce corespunde unei modificări în concentrația stratului de suprafață.

Rezultatele cantitative ale concentrării soluțiilor native de proteaze din *Aspergillus oryzae 20-9* obținute la probele S_1, S_2, S_3 – M_p sunt prezentate în tabelul 14.14 la presiuni transmembranare cuprinse între 70 și 90 kPa.

Purificarea proteazelor neutre prin adsorbție pe hidroxilapatită. Prin cromatografia pe hidroxilapatită, proteinele sunt absorbite de gelurile cristaline de hidroxilapatită, o formă insolubilă de fosfat de calciu cu formula empirică $Ca_5(PO_4)_3OH$. Baza fizico-chimică a acestui tip de fracționare nu este în întregime cunoscută, dar se pare că este implicată adsorbția anionilor de către Ca^{2+} și a cationilor de către PO_4^{3-}.

În scopul separării proteazelor neutre de cele alcaline, soluția nativă obținută în urma filtrării miceliului de *Aspergillus oryzae* a fost supusă concentrării prin ultrafiltrare și apoi precipitării cu acetonă (în raport 1/3 *v/v*). Precipitatul colectat prin centrifugare a fost reluat în tampon fosfat 0,01 m, *p*H = 7,2 și supus unui tratament cu DEAE-celuloză în scopul adsorbției amilazelor prezente și depigmentării soluției înaintea cromatografierii pe hidroxilapatită. Filtratul rezultat în urma decolorării cu DEAE-celuloză s-a aplicat pe o coloană cu hidroxilapatită (10 x 1,5 cm), echilibrată în prealabil cu soluție de acetat de calciu 0,1%. Proteazele neutre s-au separat prin eluarea coloanei în gradient de tampon fosfat, culegându-se fracții de câte 10 ml. Diagrama de eluție este prezentată în fig. 14.15.

Fracțiile corespunzând eluției cu tampon fosfat 0,1 m au fost reunite, concentrate și liofilizate și denumite în prezentul text *fracția C*.

În urma acestor etape de purificare s-a obținut un preparat enzimatic purificat cu activitate proteolitică specifică la *p*H = 7 de 1250 UP/mg proteine, factorul de purificare fiind 9,44 (tabelul 14.15).

Analiza activității enzimatice precum și studiile de inhibiție cu EDTA, efectuate asupra celor trei maxime din curba de eluție, au demonstrat proprietățile specifice de protează neutră a *fracției C* (tabelul 14.16).

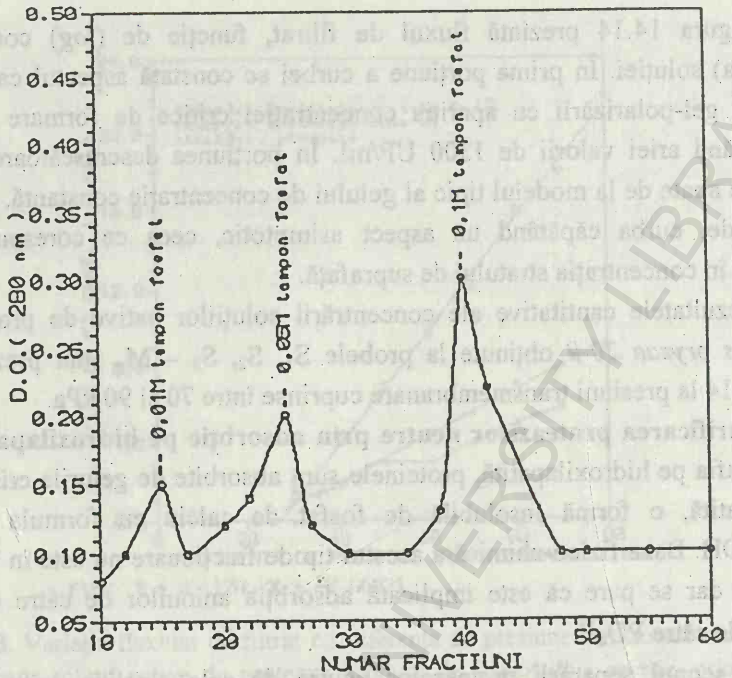


Fig. 14.15. Diagrama de eluţie a proteazelor neutre din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* de pe hidroxilapatită (10 x 1,5 cm, volumul unei fracţiuni 10 ml).

Tabelul 14.15

Etapele purificării proteazelor neutre din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Etapa de purificare	Volum, ml	Proteină, mg/ml	Activitate totală, UP	Activitate specifică, UP/mg	Factor de purificare	Randament de recuperare, %
Extract brut	5500	2,5	182×10^4	132,4		100
Ultrafiltrare	1000	7,6	165×10^4	217,1	1,63	90,7
Precipitare cu acetonă*	100	34	142×10^4	417,6	3,15	78
Tratare cu DEAE-celuloză	105	28	134×10^4	455,8	3,44	73,6
Adsorbţie pe hidroxilapatită	250	1,6	50×10^4	1250	9,44	27,5

*8 g preparat enzimatic brut, dizolvat în 100 ml acetat de calciu, 0,1% şi centrifugat.

Caracterizarea prin metoda disc-electroforezei a proteazei neutre izolate, realizată pe parcursul purificării (figura 14.16), a demonstrat că aceasta este omogenă din punct de vedere electroforetic.

Masa moleculară a proteazei neutre izolate, determinată prin metoda gel-filtrării a fost de 37 kDa, în concordanţă cu valorile indicate în literatură pentru proteaze neutre microbiene.

Studiile de separare a proteazelor neutre din extractul inițial brut de *Aspergillus oryzae 20-9* prin adsorbție pe hidroxilapatită și eluate în tampon fosfat 0,1 m, urmate de liofilizare, au condus la obținerea unui produs purificat, omogen din punct de vedere electroforetic.

Tabelul 14.16

Cromatografia pe hidroxilapatită a proteazelor din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Fracții de pe hidroxilapatită	Volum ml	Proteină mg/ml	Activitate* proteazică UP/ml	Activitate totală UP	Inhibiție** 10^{-3} m EDTA	Inhibiție** 10^{-3} m DIFP
A	45	0,6	850	$3,8x10^4$	5	75
B	50	0,9	400	$2,0x10^4$	–	–
C	250	1,6	2000	$50x10^4$	85	0

* Determinată pe cazeină, la 37°C, *p*H=7.

** Inhibiția activității proteazei, după o incubare de 30 min, cu soluție mM de inhibitor – EDTA și DIFP (diizopropil fluor fosfat) (exprimată în procente de inhibiție).

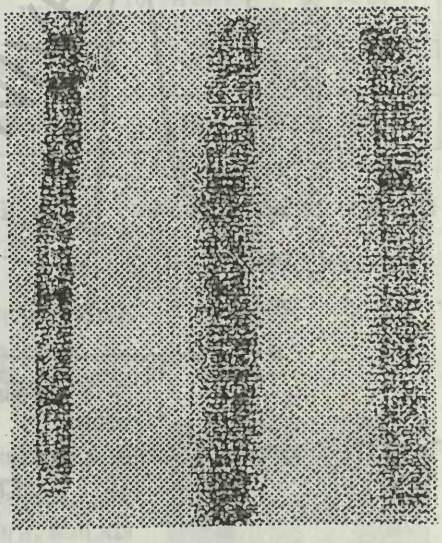


Fig.14.16. Separarea electroforetică a proteazelor neutre din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* în diferite etape de purificare, la temperatura 25°C, în mediu alcalin (TRIS 0,05 m/glicocol, *p*H=8,8); 5 mA/tub, timp de 180 min; *A* – extract inițial brut; *B* – filtrat, după tratare cu DEAE-celuloză; *C* – eluat de pe hidroxilapatită (*fracția C*).

Purificarea proteazelor alcaline prin cromatografie pe CM-celuloză. Pentru separarea proteazelor alcaline din amestecul de proteaze existent în preparatul enzimatic brut de *Aspergillus oryzae*, s-a apelat la schimbătorul de cationi celulozic CM-celuloză.

Înainte de trecerea pe o astfel de coloană, preparatul enzimatic brut a fost supus operației de precipitare fracționată cu acetonă. S-a constatat că adăugarea a 1 volum acetonă în prezența acetatului de calciu 2% conduce la precipitarea unei fracțiuni bogate în amilaze (care se îndepărtează), proteazele neutre și alcaline rămânând în supernatant. Mărind concentrația solventului organic până la 66%, din

supernatant a precipitat o fracțiune îmbogățită în protează, care s-a separat prin centrifugare. Precipitatul obținut s-a redizolvat în soluție acetat de calciu 0,1%, la *p*H = 6,4 și s-a aplicat pe o coloană de CM-celuloză (11 x 2 cm). Proteaza alcalină s-a eluat cu NaCl 0,05 m în acetat de calciu 0,1%, culegându-se fracțiuni de 5 ml. Diagrama de eluție este prezentată în figura 14.17.

În urma acestor etape de purificare s-a obținut un preparat enzimatic purificat, cu activitate proteolitică specifică la *p*H = 8,8 de 476 UP/mg proteină. Factorul de purificare a fost 3,17 (tabelul 14.17).

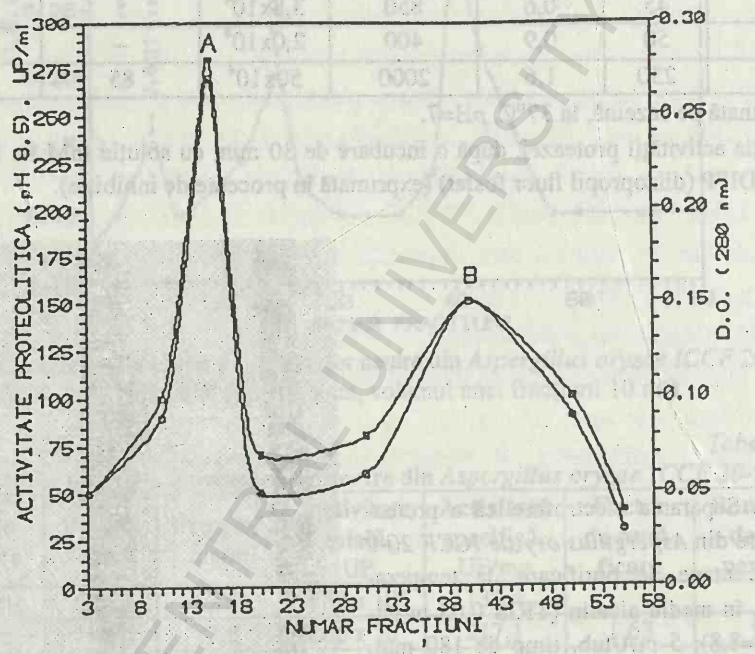


Fig.14.17. Diagrama de eluție a proteazelor alcaline din *Aspergillus oryzae* de pe CM-celuloză.

Tabelul 14.17

Etapele purificării proteazelor alcaline din *Aspergillus oryzae 20-9*

Fracțiunea	Volum, ml	Proteină, mg/ml	Activitate totală		Activitate specifică*, UP/mg	Factor de purificare	Randament de recuperare, %
			*p*H=7	*p*H=8,5			
1	2	3	4	5	6	7	8
Extract brut	800	2	32×10^4	24×10^4	150	1	100
Ultrafiltrare	200	4,5	31×10^4	22×10^4	244	1,62	91

FCUAIȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 14.17 (continuare)

1	2	3	4	5	6	7	8
Precipitare cu acetonă (pp II)	50	8	23×10^4	16×10^4	400	2,66	72
Adsorbţie pe CM-celuloză	70	3	3×10^4	10×10^4	476	3,17	62

*Estimată la *p*H=8,5, ignorând contaminarea la *p*H=7.

Tabelul 14.18

Cromatografia pe CM-celuloză a proteazelor din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9*

Fracţii de pe CMC	Volum, ml	Proteină, mg/ml	Activitate proteazică*, UP/ml	Activitate totală, UP	Inhibiţie **, 10^{-3} M EDTA	Inhibiţie **, 10^{-3} M DIFP
A	70	3	143,1	10×10^4	20	90
B	40	1,2	2	80×10^4	30	70

*Estimată la *p*H=8,5.

** Inhibiţia activităţii proteazei după o incubare 30 min cu 1 mM inhibitor (în procente de inhibiţie).

Analiza activităţii enzimatice precum şi studiile de inhibiţie efectuate asupra celor două maxime din curba de eluţie au demonstrat proprietăţile specifice de protează alcalină serinică a preparatului enzimatic purificat.

Caracterizarea proteazei alcaline izolate, prin cromatografie pe CM-celuloză s-a efectuat prin metoda disc-electroforezei. Enzima s-a dovedit a fi omogenă din punct de vedere electroforetic (fig. 14.18).

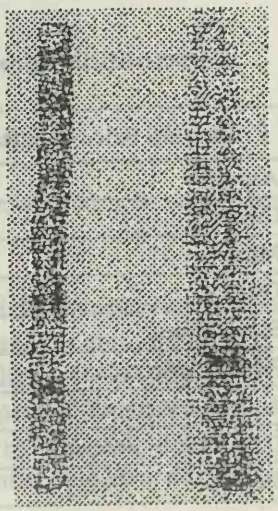


Fig.14.18. Separarea electroforetică a proteazelor alcaline din *Aspergillus oryzae ICCF 20-9* – temperatura 25°C, mediu alcalin (TRIS 0,05 m/glicocol *p*H = 8,8), 5 mA/tub, 180 min: *A* – extract iniţial brut; *B* – eluat de pe CM-celuloză, *fracţia A*.

Masa moleculară a proteazei alcaline purificate, determinată prin metoda gel-filtrării, a fost de 29 kDa, în concordanţă cu datele din literatura de specialitate care indică pentru proteazele alcaline serinice mase moleculare cuprinse între 25 şi 30 kDa.

Obţinerea unor preparate farmaceutice cu activitate enzimatică proteolitică. În vederea obţinerii de medicamente active în tratamentul plăgilor necrotice sau în tratamente digestive este necesară extracţia, purificarea şi caracterizarea proteazelor din lichidul extracelular produs de tulpini de *Aspergillus oryzae*, indicate în acest scop.

Produsul enzimatic obţinut, condiţionat corespunzător, se foloseşte la îndepărtarea cheagurilor de fibrină, sfacelelor înaintea aplicării cicatrizantelor în tratamentul plăgilor. Principiul activ al acestui produs este constituit din complexul enzimatic proteolitic capabil să hidrolizeze, la *p*H fiziologic, diferite proteine existente în plăgi, permiţând astfel îndepărtarea rapidă a acestora şi aplicarea cicatrizantelor pe o rană bine curăţată.

În scopul obţinerii unui astfel de produs farmaceutic, colectivul ICCF a apelat la tulpina *Aspergillus oryzae20-9* cultivată timp de 48 de ore la 30°C, în bioreactoare tip Ultroferm 1601 LKB-Suedia, în condiţii de aerare şi agitare pe mediul cu lactoză.

Extractul brut obţinut după separarea prin filtrare a miceliului de *Aspergillus oryzae 20-9* s-a supus operaţiilor de izolare şi purificare a complexului proteolitic după un protocol descris în fig. 14.19. Procedeul aplicat a condus la obţinerea unui preparat enzimatic cu activitate proteolitică de 1,2 UP^{FIP}/mg (unităţi proteazice standardizate de Federaţia Internaţională de Farmacie, exprimate în micromoli tirozină /min).

Produsul finit s-a condiţionat sub formă de pulbere liofilizată, caracteristicile fizico-chimice fiind prezentate în tabelul 14.19.

Tabelul 14.19

Caracteristicile fizico-chimice ale preparatului enzimatic farmacologic-activ în tratamentul plăgilor

Proprietăţi fizico-chimice şi biochimice	Condiţii de admisibilitate
Aspect	Pulbere amorfă
Culoare	Alb-gri
Miros	Slab caracteristic
Gust	Slab amar
Solubilitatea	Solubil în apă şi ser fiziologic
Pierdere prin uscare	Maximum 6%
Activitate proteolitică	Minimum 1 UP^{FIP}/mg
Concentraţie proteică	Minimum 0,25 mg/mg preparat
Sterilitate (Cf. FR.X)	Steril

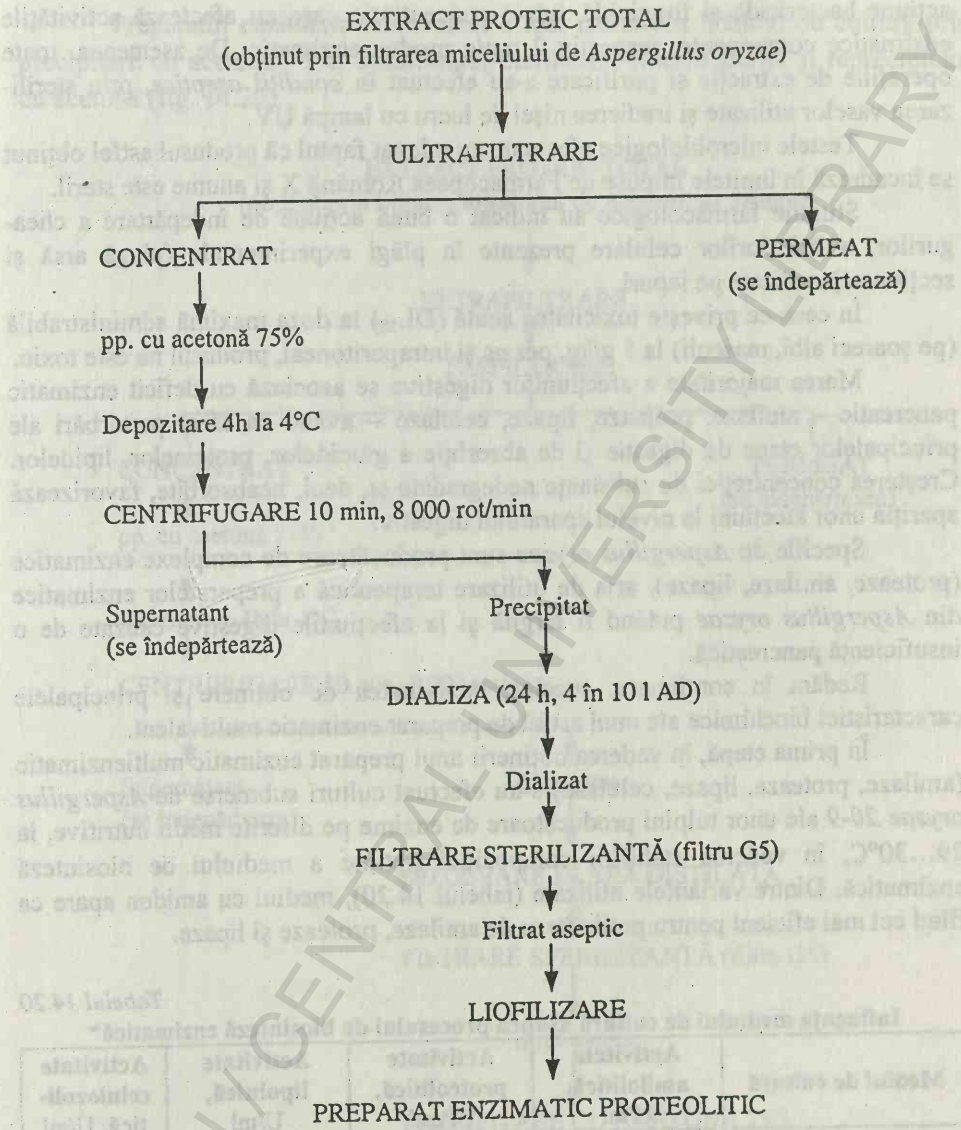


Fig 14.19. Izolarea şi purificarea unui preparat enzimatic proteolitic utilizat în tratamentul plăgilor necrotice.

Originea fungică precum şi utilizarea produsului în tratamentul plăgilor deschise a impus un control microbiologic riguros al preparatului obținut.

Din acest motiv, în vederea eliminării posibilităților de contaminare suplimentară, *înainte de faza de ultrafiltrare*, în soluția perfect limpede rezultată după faza de filtrare s-a adăugat fenol în raport de 5 mg/1000 ml soluție enzimatică; *înainte de faza de liofilizare* s-a adăugat mertiolat de sodiu, produs cu

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acțiune bactericidă și fungicidă, într-o concentrație care nu afectează activitățile enzimatice componente, respectiv 2 mg/g produs enzimatic. De asemenea, toate operațiile de extracție și purificare s-au efectuat în *condiții aseptice*, prin sterilizarea vaselor utilizate și iradierea nișei de lucru cu lampă UV.

Testele microbiologice efectuate au relevat faptul că produsul astfel obținut se încadrează în limitele impuse de Farmacopeea Română X și anume este steril.

Studiile farmacologice au indicat o bună acțiune de îndepărtare a cheagurilor, a dritusurilor celulare prezente în plăgi experimentale (plagă arsă și secționată) realizate pe iepuri.

În ceea ce privește toxicitatea acută (DL_{50}) la doza maximă administrabilă (pe șoareci albi, masculi) la 5 g/kg, per os și intraperitoneal, produsul nu este toxic.

Marea majoritate a afecțiunilor digestive se asociază cu deficit enzimatic pancreatic – amilaze, proteaze, lipaze, celulaze – având ca efect perturbări ale principalelor etape de digestie și de absorbție a glucidelor, proteinelor, lipidelor. Creșterea concentrației de substanțe nedegradate și, deci, neabsorbite, favorizează apariția unor afecțiuni la nivelul aparatului digestiv.

Speciile de *Aspergillus oryzae* sunt producătoare de complexe enzimatice (proteaze, amilaze, lipaze), aria de utilizare terapeutică a preparatelor enzimatice din *Aspergillus oryzae* putând fi lărgită și la afecțiunile digestive cauzate de o insuficiență pancreatică.

Redăm în continuare, succint, modalitatea de obținere și principalele caracteristici biochimice ale unui astfel de preparat enzimatic multivalent.

În prima etapă, în vederea obținerii unui preparat enzimatic multienzimatic (amilaze, proteaze, lipaze, celulaze) s-au efectuat culturi submerse de *Aspergillus oryzae 20-9* ale unor tulpini producătoare de enzime pe diferite medii nutritive, la 29...30°C, în vederea stabilirii compoziției optime a mediului de biosinteză enzimatică. Dintre variantele utilizate (tabelul 14.20), mediul cu amidon apare ca fiind cel mai eficient pentru producerea de amilaze, proteaze și lipaze.

Tabelul 14.20

Influența mediului de cultură asupra procesului de biosinteză enzimatică*

Mediul de cultură	Activitate amilolitică, U/ml	Activitate proteolitică, UP/ml	Activitate lipolitică, U/ml	Activitate celulozolitică, U/ml
Făină de soia 2%, amidon 1,5 %	60	200	0,3	1,6
Făină de soia 2,5%, lactoză 1,5 %	20	300	0,21	1,2
Făină de soia 2,5%, glucoză 1 %	22	250	0,24	0,0

* Compoziția mediului de cultură, %: făină de soia – 2; amidon solubil – 1,5; tărâțe de grâu – 0,5; fosfat monopotasic – 2,7; sulfat de magneziu – 0,012; micropilot (bioreactoare de 14 l încărcate cu 8 l mediu de cultură).

Preparatul enzimatic multivalent a fost izolat din lichidul de cultură prin precipitare cu acetonă 75%, ultrafiltrare, diafiltrare, filtrare sterilă şi reprecipitare cu acetonă (fig. 14.20).

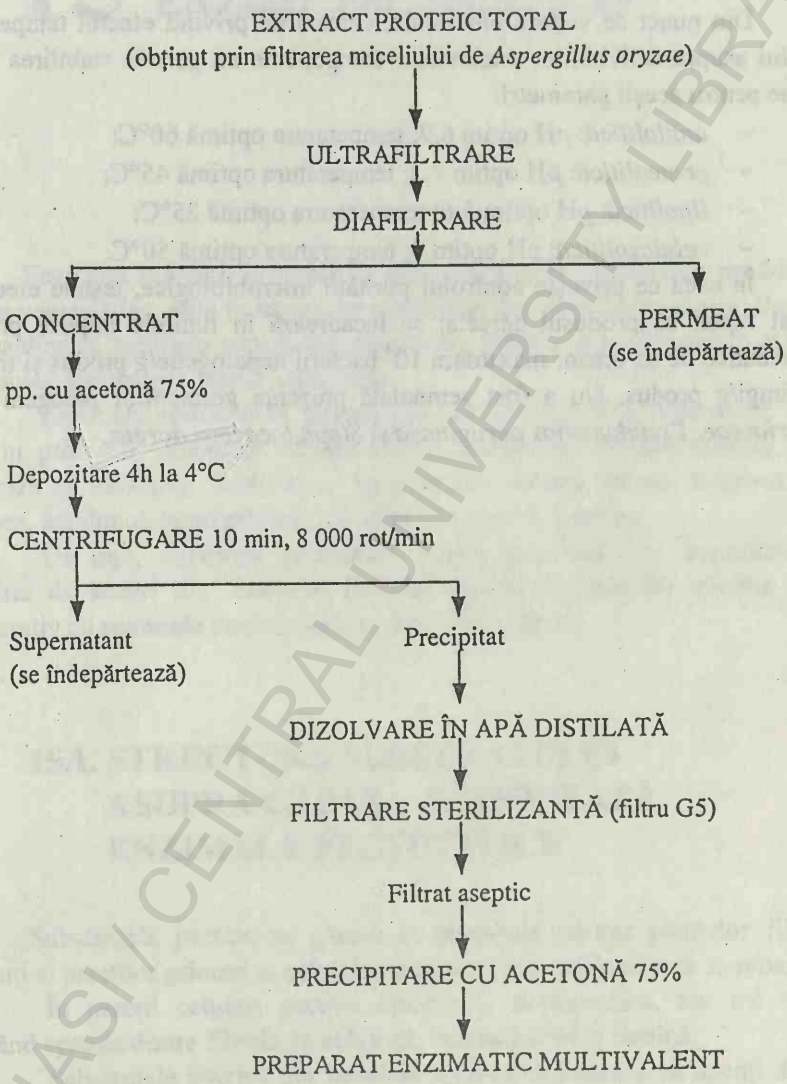


Fig.14.20. Obţinerea unui preparat enzimatic multivalent utilizat în tratamentele digestive.

Preparatul multienzimatic, astfel obţinut, prezintă următoarele activităţi enzimatice:

- *amilolitică*: 623 UE/g;
- *proteolitică*: 100 000 UP/g;

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– *lipolitică*: 3,2 x 10^{-3} UE/g;
– *celulozolitică*: 17,4 UE/g.

Preparatul multienzimatic se prezintă sub formă de pulbere alb-gri, solubil în apă şi ser fiziologic.

Din punct de vedere biochimic, cercetările privind efectul temperaturii şi *p*H-ului asupra activităţilor enzimatice componente au permis stabilirea valorilor optime pentru aceşti parametri:

– *amilolitică*: *p*H optim 6,9; temperatura optimă 60°C;
– *proteolitică*: *p*H optim 7,2; temperatura optimă 45°C;
– *lipolitică*: *p*H optim 5,6; temperatura optimă 25°C;
– *celulozolitică*: pH optim 6; temperatura optimă 50°C.

În ceea ce priveşte controlul purităţii microbiologice, testele efectuate au relevat faptul că produsul cercetat se încadrează în limitele impuse produselor farmaceutice de uz uman: maximum 10^4 bacterii nepatogene/g produs şi maximum 10^2 fungi/g produs. Nu a fost semnalată prezenţa germenilor patogeni *Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa* şi *Staphilococcus aureus*.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15 ENZIME PECTOLITICE

Enzimele utilizate în industria alimentară şi în prelucrarea produselor de origine vegetală fac parte în marea lor majoritate din clasa hidrolazelor. Pentru a le putea aplica cu rezultate superioare, repetabile, trebuie să le cunoaştem atât pe ele cât şi substratul asupra căruia acţionează.

Enzimele utilizate în tehnologiile de prelucrare a produselor vegetale sunt, în principal, enzimele celulozolitice, amilolitice, hemicelulazele, glucozizomeraza şi enzimele pectolitice. Substraturile asupra cărora acţionează sunt: celuloza, amidonul, hemiceluloza, glucoza şi respectiv pectina.

De fapt, enzimele pectolitice ocupă locul cel mai important pentru industria de sucuri din fructe şi legume. Ponderea celorlalte enzime utilizate comparativ cu enzimele pectolitice este mult mai scăzută.

15.1. STRUCTURA SUBSTRATULUI ASUPRA CĂRUIA ACŢIONEAZĂ ENZIMELE PECTOLITICE

Substanţele pectice se găsesc în ţesuturile tuturor plantelor fiind constituenţi ai pereţilor primari ai celulelor şi ai lamelelor mijlocii care le separă.

În pereţii celulari pectina insolubilă, protopectina, are rol structural umplând spaţiile dintre fibrele de celuloză, hemiceluloză şi lignină.

Substanţele pectice din lamelele mijlocii acţionează ca agenţi de legare, de cimentare. Pentru a-şi îndeplini rolul de "ciment celular", aceste pectine, mai ales în plantele neajunse la maturitate, sunt insolubile în apă. În perioada de maturare se observă o destrămare a lamelelor mijlocii, apariţia unor spaţii intracelulare şi solubilizarea unei mari părţi din protopectină. Cu cât planta, sau partea din plantă (fructul), este mai coaptă, cu atât cantitatea de pectină solubilizată de enzimele proprii este mai mare, fapt ce determină înmuierea acestora.

PUC CRAIOVA UNIVERSITY LIBRARY

Prin termenul de "substanţe pectice" folosit în mod uzual se înţelege un complex de compuşi carbohidraţi coloidali: protopectina, acizii pectinici (pectina) şi acizii pectici (pectaţi).

Substanţele pectice sunt heteropolizaharide constituite, în principal, din lanţuri liniare formate din unităţi de acid D-galacturonic asociate prin legături alfa-1,4-glicozidice. Funcţiile carboxilice sunt mai mult sau mai puţin esterificate cu grupări metil şi funcţiile libere sunt mai mult sau mai puţin neutralizate.

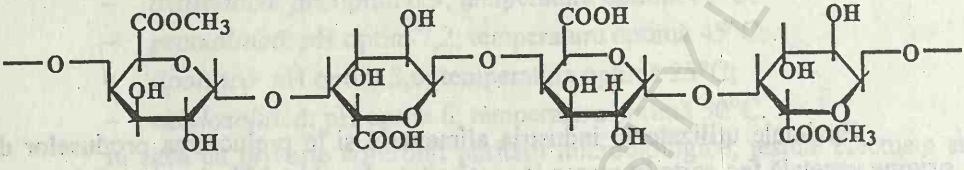


Fig.15.1. Secvenţă din molecula unei pectine.

Legăturile glicozidice conferă polimerului o structură spaţială elicoidală.

Termenul de protopectină este utilizat pentru a desemna substanţele pectice înalt esterificate şi insolubile în apă. Acizii pectici sunt în general solubili în apă, dar în condiţii favorabile (în prezenţă de zaharoză în mediu acid sau de ioni metalici, de exemplu ionii de calciu) pot forma geluri, proprietate care joacă un rol important în prepararea gemurilor şi marmeladei.

Hidroliza totală a substanţelor pectice purificate dă naştere unui amestec cu următoarea compoziţie:

- acid D-galacturonic 65–95%;
- metanol 3–8%;
- acid acetic 0–6%;
- zaharuri neutre 8–10%.

Proprietăţile fizice ale substanţelor pectice depind de: greutatea lor moleculară; gradul de esterificare; configuraţia spaţială a macromoleculelor; prezenţa legăturilor de hidrogen şi a legăturilor cationice polivalente. *p*H-ul soluţiilor de pectină variază între 2,8 şi 3,4, în funcţie de gradul de esterificare.

15.2. TIPURI DE ENZIMELE PECTOLITICE

Enzimele pectolitice sunt sintetizate de plante şi de microorganisme. În timpul maturării, coacerii, depozitării şi prelucrării industriale a fructelor au loc schimbări în conţinutul şi structura substanţelor pectice. Prezenţa substanţelor

pectice în toate plantele determină existența unui complex enzimatic capabil să le degradeze.

În urma amplelor studii efectuate asupra complexelor enzimatice pectolitice din diferite surse, de-a lungul anilor s-a stabilit că ele pot fi împărțite în două grupe:

- enzime de demetoxilare (saponifiante);
- enzime depolimerizante.

Enzimele saponifiante. Sunt esteraze care catalizează demetoxilarea pectinei eliberând metanol. În mod uzual sunt denumite *pectinaze* sau *pectin depolimeraze*, *pectin liaze*, *pectin esteraze*, *pectim etilesteraze*, *pectin demetoxilaze*, de unde și prescurtările utilizate în mod obișnuit, PME sau PE.

Denumirea corectă, științifică, conform nomenclaturii stabilite de Comisia de Enzimologie a IUB/IUPAC, este carboxilesteraze (E.C. 3.1.1).

Studiile asupra pectinesterazelor obținute din fungi sau bacterii sunt destul de limitate în comparație cu cele efectuate asupra celor din vegetale. În țesuturile vegetale, PME sunt puternic absorbite de componentele tisulare insolubile în apă.

Pectinesterazele își încep atacul asupra grupărilor esterice vecine unei grupări carboxilice libere și apoi acționează de-a lungul moleculei. Nu acționează însă asupra esterilor metilici ai acizilor galacturonic, digalacturonic și trigalacturonic (mono-, di- și triesteri).

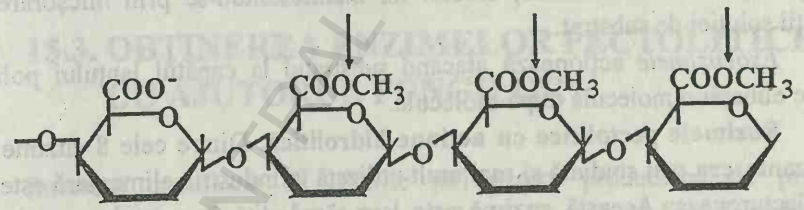


Fig.15.2. Atacul preferențial al PE asupra grupărilor metoxilate.

Creșterea numărului de grupări carboxil eliberate duce la inhibarea PE și se poate explica prin creșterea numărului sarcinilor negative ale substratului.

Sărurile metalelor alcaline și alcalino-pământoase neutralizează grupările acide libere, fapt ce explică rolul de activatori ai ionilor Na^+, K^+, Ca^{2+} și Mg^{2+} în concentrații mici: PE sunt inhibate de polifenoli, detergenți, Ag^+, fosfat, nucleotide și chiar de glucide.

PE obținute cu ajutorul fungilor și bacteriilor au, în general, mase moleculare cuprinse între 35 000 și 37 000 și *p*H-ul optim de acțiune situat între valorile 4,5 și 5 pentru fungi și 7,5 – 8 pentru bacterii.

Principalele microorganisme utilizate pentru obținerea de PE sunt: bacteriile aparținând speciilor *Clostridium multifermentans, Phytophthora infestans, Xanthomonas campestris, Erwinia chrysanthemi*; fungii: *Alternaria brassicae,*

Aspergillus niger, A. flavus, Fusarium oxysporum, Botrytis cinerea; sau drojdia *Saccharomyces vini.*

Enzimele depolimerizante. Sunt glicozidaze care acţionează asupra lanţurilor poligalacturonice hidrolizând legăturile alfa-1,4-glicozidice, diminuând astfel gradul de polimerizare al pectinei.

În prezent, enzimele pectolitice sunt clasificate conform schemei propuse de Neukom, ţinându-se seama de următoarele criterii:

- scindarea hidrolitică sau transeliminativă a legăturii glicozidice;
- substratul asupra căruia se acţionează (acizi pectici sau pectinici);
- mecanismul de scindare endo sau exo.

Astfel, după primul criteriu avem enzime pectolitice care scindează legăturile α-1,4-glicozidice în prezenţa apei şi enzime transeliminative prin acţiunea cărora scindarea legăturii α-1,4-glicozidice se realizează prin transeliminarea unui atom de hidrogen şi formarea unei duble legături între atomii de carbon C4 şi C5 ai porţiunii aglicon a substratului.

Când substratul atacat este acidul pectinic, enzimele hidrolitice sunt denumite polimetilgalacturonaze (PMG), iar cele transeliminative sunt pectinliaze (PL sau PTE). Când substratul este acidul pectic avem poligalacturonaze (PG) şi, respectiv, pectatliaze (PAL sau APTE).

Dacă acidul pectinic sau pectic este atacat în interiorul moleculei, la întâmplare, avem *endoenzime*, efectul lor manifestându-se prin micşorarea vâscozităţii soluţiei de substrat.

Exoenzimele acţionează atacând substratul la capătul lanţului poligalacturonic eliberând moleculă după moleculă.

Enzimele pectolitice cu acţiune hidrolitică. Dintre cele 8 enzime depolimerizante, cea mai studiată şi mai mult utilizată în industria alimentară este endopoligalacturonaza. Această enzimă este larg răspândită în regnul vegetal şi este produsă de diferite microorganisme saprofite sau fitopatogene în vederea invadării ţesuturilor vegetale. Astfel a fost identificată în fructe (mere, piersici, citrice, ananas), în legume (tomate, castraveţi etc.), într-o serie de plante erbacee, în rădăcina de morcov şi în numeroase microorganisme (*Aspergillus niger, Aspergillus japonicus, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Trichoderma koningii, Saccharomyces fragilis, Erwinia carotovora* etc.). A fost, de asemenea, identificată şi la unele specii de animale inferioare în secreţia hepato-pancreatică sau a glandelor salivare, ca de exemplu la *Helix pomatia, Turbo cormitus* etc.

Cele mai studiate sunt enzimele produse de microorganisme şi anume de fungi, deoarece acestea sunt utilizate în mod curent pentru obţinerea de preparate enzimatice pectolitice.

Acţiunea poligalacturonazei asupra unei soluţii de substrat se manifestă prin rapida scădere a vâscozităţii soluţiei şi o uşoară creştere a numărului de

grupări reducătoare. *p*H-ul optim al majorității poligalacturonazelor, atât din surse vegetale cât și obținute cu ajutorul fungilor, este cuprins în domeniul de 3,5 – 5,0.

Enzimele pectolitice transeliminative. Aceste enzime catalizează desfacerea legăturilor α-1,4-glicozidice din substanțele pectice printr-un mecanism de transeliminare, rezultând derivați nesaturați ai acidului galacturonic.

Endo-pectinliaza (endo-PL sau endo PTE) este cel mai frecvent găsită în preparate realizate cu ajutorul fungilor din genul *Aspergillus*. Este prima enzimă descoperită din seria transeleminazelor, în timp ce enzima corespondentă exo nu a fost încă identificată cu certitudine. Este produsă, de asemenea, și de alte microorganisme ca *Rhizoctonia solani* sau *Penicillium digitatum*. Acțiunea acestei enzime se manifestă prin scăderea rapidă a vâscozității unei soluții de acid pectinic, apariția unui număr mare de grupări reducătoare și, fenomen ce o deosebește net de poligalacturonaze, modificarea densității optice, prezentând un maxim de absorție la 235 nm.

Toate enzimele pectolitice sunt active pe un domeniu de temperatură între 8 și 55°C, și au optimum de activitate în domeniul de 30...45°C. Sub 8°C activitatea scade asimptotic spre zero, iar peste 55°C, datorită naturii proteice a enzimelor, intervine treptat degradarea termică, pe măsură ce temperatura crește.

15.3. OBȚINEREA ENZIMELOR PECTOLITICE CU AJUTORUL FUNGILOR

Interesul manifestat de diferite țări pentru producerea de preparate enzimatice pectolitice datează încă din anul 1935. O serie de firme producătoare furnizează în prezent astfel de preparate enzimatice sub diverse denumiri: Pectinol, Pektasin, Filtrajol, Filtrazym, Rohamet, Ultrazym, Macerozym, Pectinex, Pectofoetidin etc. La noi în țară s-a produs în condițiile stabilite de Ilie Vasilescu (prin cultură de suprafață) un preparat pectolitic brut denumit inițial Aspergol, iar mai târziu Linpectin.

Produsul obținut în cadrul întreprinderii Terapia Cluj–Napoca, pe un mediu cu tărâțe de grâu și felii de morcov, avea o granulație variabilă, culoare gri-cenușiu până la negru și miros de "mucegai". Toate acestea alcătuiau o serie de dezavantaje, situând produsul Linpectin în zona produselor necompetitive și ineficiente, ceea ce a determinat orientarea celor interesați spre obținerea acestor preparate în condiții submerse.

O metodă de obținere a enzimelor pectolitice în condiții submerse folosește ca microorganism producător o tulpină de *Aspergillus niger* cultivată pe un mediu

lichid. Inoculul se poate obține fie prin biosinteza de suprafață pe medii solide, fie prin metode submerse (Pele M. şi colab.). În compoziția mediului solid intră, în general, tărâțele de grâu, rumeguşul, făina de orez, tăițeii de sfeclă. Preinoculul se obține prin însămânțarea pe mediu de laborator agarizat a tulpinii de *Aspergillus niger*. Eprubetele însămânțate sunt ținute timp de 62 – 72 de ore la 28...30°C. Mediul lichid pentru inocul trebuie să conțină surse asimilabile de carbon şi azot, în compoziția lui intrând: tescovină de mere (4%), melasă (1,5%), $(NH_4)_2SO_4$(0,4%), $(NH_4)_2HPO_4$(0,07%), $CaCO_3$(0,4%). În mediul astfel pregătit şi sterilizat se introduce suspensia de miceliu (inocul vegetativ) în proporție de 5% sau suspensia de spori în proporție de 1%. Dezvoltarea se face la vibroterm, în flacoane agitate, menținându-se un *p*H de 4,8 – 6,0, la o temperatură de 28...30°C, timp de 16 – 48 ore. Timpul de dezvoltare pentru *Aspergillus niger* se schimbă în funcție de modul de inoculare al mediului: 16 – 19 ore pentru inoculare cu miceliu, 20 – 48 ore pentru inoculare cu spori.

Biomasa rezultată este un inocul care poate fi direct folosit pentru inocularea mediului de producție. Biosinteza propriu-zisă se realizează în bioreactoare de diferite capacități (50 – 100 l), prevăzute cu un sistem de agitare de tip disc-turbină cu palete plane la 45°, utilizând acelaşi mediu de cultură ca şi la inocul, la o temperatură de 28...30°C.

Pe parcursul bioprocesului se aplică diferite regimuri de aerare şi agitare. Variația parametrilor de agitare-aerare este dictată atât de evoluția oxigenului dizolvat rezidual, care este menținut la valori relativ mari, cât şi de creşterea vâscozității ca urmare a dezvoltării abundente a biomasei, impunând intensificarea agitării pentru o amestecare eficace.

Mediul de cultură obținut se supune separării prin centrifugare a particulelor grosiere, iar filtratul obținut se concentrează sub vid, la o temperatură de 36±2°C până la 1/7 volume, ajungându-se la o activitate enzimatică de la 16,2 U/ml la 94 U/ml.

15.4. UTILIZAREA ENZIMELOR PECTOLITICE

Primele informații privind existența enzimelor pectolitice datează din mijlocul secolului trecut. Cercetările efectuate ulterior au dus la evidențierea importanței practice a acestor enzime pentru diferite sectoare ale industriei alimentare, ca, de exemplu, industria de sucuri, vinului, ceaiului, boabelor de cafea şi cacao. De asemenea, pot fi utilizate în industria textilă la topirea plantelor textile ca inul şi cânepa.

Utilizarea enzimelor pectolitice obținute industrial cu ajutorul microorganismelor a fost introdusă în prelucrarea fructelor sub formă de sucuri în 1930, de către Kertesz, în S.U.A., și de către Mehlitz în Germania.

Deși obținerea industrială a enzimelor pectolitice este printre primele tehnologii dezvoltate de obținere a enzimelor, în prezent, pe plan mondial, se obțin mult mai puține preparate enzimatice pectolitice în comparație cu alte enzime. Astfel, se apreciază că producția de preparate enzimatice pectolitice este de circa 30 t anual pe plan mondial, în timp ce producția de proteaze, de exemplu, este de circa 300 t, iar a celei mai noi enzime introduse în producția industrială, glucozizomeraza, este de 800 t.

Pectinele, făcând parte împreună cu celuloza din categoria polizaharidelor neamidonoase, au un efect negativ în alimentația animalelor monogastrice (mai ales a păsărilor) datorită digestibilității lor scăzute. Acest efect negativ poate fi înlăturat prin încorporarea de enzime pectolitice în furaje.

Enzimele pectolitice se aplică, de obicei, în hrana tineretului aviar și a broilerilor sub forma unor preparate enzimatice complexe care mai conțin și alte tipuri de enzime având ca efect reducerea vâscozității din intestine prin distrugerea unor factori antinutriționali, ca betaglucani și pentozani, și obținerea unui surplus de energie din polizaharidele slab utilizate sau total neutilizate ca pectinele și celuloza.

Un exemplu de astfel de preparat enzimatic este KEMZYME produs de firma *Kemin* Europa.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16 ENZIME LIPOLITICE

Lipazele sunt enzime ce fac parte din clasa hidrolazelor, având un rol important în metabolismul grăsimilor. Ele hidrolizează grăsimi şi uleiuri cu formare de acizi graşi liberi, diferite gliceride şi glicerină.

Trebuie arătat însă că există destule confuzii cu privire la semnificaţia exactă a termenilor de lipază şi esterază, întrucât ambele hidrolizează legăturile esterice ale acizilor carboxilici. Unii cercetători consideră că deosebirea esenţială dintre lipaze şi esteraze constă în starea fizică a substratului asupra căruia acţionează. Astfel, esterazele pot hidroliza substraturi solubile sau dispersate total, iar lipazele nu. De aceea s-a propus de Wills şi Jensen să se definească lipazele drept enzime care hidrolizează esterii la o interfaţă de tip ulei-apă, într-un mediu eterogen.

După originea lor, lipazele se pot clasifica în:

- lipaze de origine microbiană;
- lipaze din plante;
- lipaze din lapte;
- lipaze pancreatice;
- lipoprotein lipaze;
- lipaze hormon – senzitive.

16.1. OBŢINEREA LIPAZELOR DIN CULTURI MICROBIENE

16.1.1. Microorganisme producătoare de lipaze

Lipazele microbiene sunt produse de o serie de specii de bacterii, ciuperci (fungi) şi drojdii. Cele mai importante microorganisme producătoare de lipază, împreună cu activităţile lipazice maxime obţinute în mediile de cultură şi în condiţiile de determinare a activităţii, sunt prezentate în tabelul 16.1.

Tabelul 16.1

Surse de lipaze microbiene

Specia microbiană	Tipul de fermentaţie	Activitatea, EU[a]/ml	Condiţii de determinare a activităţii [c]
1	2	3	4
Bacterii			
Staphylococcus aureus	Flacoane agitate	4,5	37°C, *p*H=8,0
Pseudomonas nitroreducens	Fermentator 2 l	500,0	37°C, *p*H=9,0
Pseudomonas fragi	Fermentator 20 l	75,0	37°C, *p*H=9,0
Alcaligenes species	Fermentator 15 l	800,0	37°C, *p*H=8,7
Bacillus licheniformis	Flacoane agitate	6,0	45°C, *p*H=8,5
Drojdii			
Candida cylindracea	Flacoane agitate	b	30°C, *p*H=7,0
Saccharomycopsis lipolytica	Flacoane agitate	40,0	30°C, *p*H=9,5
Candida lipolytica	Fermentator 2l	1,0	37°C, *p*H=8,2
Fungi			
Aspergillus luchnensis	Mediu solid	–	40°C, *p*H=7,0
Aspergillus niger	Flacoane agitate	4,0	37°C, *p*H=6,5
Rhizopus delemar	Submers	60,0	30°C, *p*H=5,6
Rhizopus arrhizus	Fermentator 100 l	35,0	37°C, *p*H=7,5
Rhizopus delemar	Fermentator tip turn şi fermentator 3 l	460,0	30°C, *p*H=8,5
Geothricum candidum	Cultură lichidă statică	6,0	32°C, *p*H=8,5
Geothricum candidum	Flacoane agitate	170,0	30°C, *p*H=5,6
Mucor lipolyticus	Flacoane agitate	90,0	37°C, *p*H=8,0
Humicola lanuginosa	Fermentator 600 l	55,0	45°C, *p*H=8,0
Phycomyces species	Fermentator	160,0	37°C, *p*H=7,0
Penicillium funiculosum	Flacoane agitate	b	37°C, *p*H=8,0

[a]: 1EU = cantitatea de enzimă care determină eliberarea unui μmol acid gras/min în condiţii standard.

[b]: Activitatea enzimatică este exprimată în alte unităţi, care cu datele existente nu au putut fi convertite în EU.

[c]: Drept substrat pentru determinarea activităţii s-a utilizat în toate cazurile uleiul de măsline.

În mod uzual, lipazele microbiene sunt enzime extracelulare. Lipazele extracelulare pot fi obţinute din culturi tinere, de preferinţă în timpul fazei de creştere logaritmică, fiind în aceasta perioada mai puţin afectate de liza celulelor. Unii cercetători au raportat existenţa şi a unor lipaze intracelulare, cum ar fi cele produse de bacteriile din specia *E. coli, Streptococcus thermophilus* şi *Strepto-*

coccus lactis, drojdii – *Saccharomycopsis lipolytica*, sau fungi – *Rhizopus chinensis*.

Lipazele de origine fungică au fost obținute atât din culturi pe medii solide cât și din culturi submerse. Dintre fungii filamentoși cultivați pe medii solide, rezultate bune s-au obținut cu *Mucor miehei, Penicillium camemberti* și *Penicillium candidum*.

În general, însă, numărul referințelor privitoare la obținerea de lipaze din culturi pe medii solide este scăzut.

16.1.2. Obținerea lipazelor în culturi submerse

Majoritatea cercetărilor au stabilit că lipazele se pot obține cel mai avantajos din culturi submerse aerate.

Factorii care influențează biosinteza lipazelor în culturi submerse sunt prezentați în cele ce urmează.

Influența compoziției mediului de cultură. Tipul și concentrația componentelor mediului de cultură pentru biosinteza lipazei diferă foarte mult de la o tulpină la alta și sunt propice unor optimizări ulterioare. Aceste medii conțin, în general, drept sursă de carbon un glucid simplu sau complex, însă unele drojdii producătoare de lipază pot fi cultivate, de asemenea, pe uleiuri sau hidrocarburi. Producția de lipază în general nu depinde decât în mică măsură de natura glucidului utilizat.

O altă problemă importantă este natura sursei de azot și realizarea unui raport optim azot/carbon în mediul de cultură. O serie de surse au semnalat că lipaza se obține cel mai bine dacă microorganismul este crescut pe un mediu conținând peptonă. Anumite tipuri de peptone sunt mai puțin potrivite ca și constituenți ai mediului de cultură decât altele, cu toate că dezvoltarea microorganismului nu este afectată. Conform datelor din literatura de specialitate, randamentul lipazei obținute a crescut considerabil dacă mediul a avut în compoziție hidrolizat de cazeină, triptonă, polipeptonă sau făină de soia.

În cazul biosintezei lipazei din *Pseudomonas species*, cea mai potrivită sursă de azot s-a dovedit a fi ureea. Dacă pentru obținerea lipazei se folosește *Candida lipolytica*, rezultatele cercetărilor indică drept sursă de azot sulfatul de amoniu și ureea.

Un mare număr de cercetători au studiat obținerea lipazelor pe medii sintetice. Astfel, un studiu comparativ efectuat pe 41 de medii dehidratate diferite a dus la formularea unui mediu sintetic pentru biosinteza lipazei din *Pseudomonas fungi* prin înlocuirea peptonei cu un amestec de arginină, lizină, acid aspartic și acid glutamic. S-au obținut randamente în lipază de aproape 90% față de cele obținute pe mediu cu peptonă.

Prezența lipidelor în mediul de cultură poate induce, iar în alte cazuri poate inhiba, producerea lipazei. Chander și alții au constatat că adăugarea de lipide în mediul de cultură pentru biosinteza lipazelor de către *Penicillium chrysogenum, Fusarium solani* și *Geothricum candidum* inhibă creșterea microorganismelor și determină scăderea producției de lipază. În ceea ce privește lipaza din *Mucor mucedo*, s-a constatat că introducerea de lipide în mediul de cultură are un efect diferențiat. Astfel, dintre trigliceridele testate (în concentrație de 0,1% raportat la mediul de bază), tributirina a determinat creșterea producției de lipază cu 66%, în timp ce trigliceridele conținând acizi grași nesaturați cu catenă lungă (ulei de măsline, ulei de floarea-soarelui, ulei de mușt etc.), au avut acțiune ușor inhibitoare. Efectul inhibitor cel mai puternic l-a avut trioleina, care a cauzat o reducere cu 58% a producției de lipază. Creșterea randamentului în lipază în prezența tributirinei a fost menționată în cazul lui *Penicillium roqueforti*, în timp ce prezența uleiului de porumb și a celui de măsline determină inhibarea acestuia cu 21, respectiv 29%.

Una din sursele cele mai importante de lipază pentru biotehnologii este *Aspergillus niger*. Un studiu cuprinzător referitor la biosinteza lipazei din culturi submerse de *A.niger* a stabilit compoziția optimă a mediului de cultură, plecând de la un mediu de bază constituit din: 0,1% NH_4NO_3; 0,2% KH_2PO_4; 0,04% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 1% zaharoză și 1% ulei de măsline (Ioniță P. și colab.).

Efectul diferitelor surse de carbon asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului ciupercii este prezentat în tabelul 16.2. S-a determinat că sursa optimă de carbon este zaharoza. Glucoza, maltoza și fructoza determină o creștere bună a miceliului, dar randamentul în lipază este mai scăzut. Concentrația optimă de zaharoză din mediul de cultură s-a determinat a fi de 1%.

Tabelul 16.2

Efectul sursei de carbon asupra randamentului în lipază și al creșterii miceliului de *A.niger* în cultură submersă

Sursa de carbon (1%)	Activitatea lipazică (unități/5ml mediu de cultură după 96 ore)	Greutatea miceliului uscat (g/l , după 96 ore)
Glucoză	9,2	13,0
Maltoză	7,6	11,5
Fructoză	8,2	11,0
Amidon solubil	1,6	10,0
Lactoză	7,8	8,6
Zaharoză	22,2	13,4
Xiloză	Urme	4,0
Rafinoză	Urme	2,0
Citrat de Na	Urme	2,5
Acetat de Na	Urme	1,8

În tabelul 16.3 sunt prezentate rezultatele încercărilor cu diverse surse de azot de natură organică sau anorganică. Se poate observa că sursa de azot cea mai bună este azotatul de amoniu, concentrația sa optimă în mediul de cultură fiind 0,1%.

Tabelul 16.3

Efectul sursei de azot asupra randamentului în lipază și al creșterii micheliului de *A.niger* în culturi submerse

Sursa de azot (0,1%)	Activitatea lipazică (unități/5ml mediu de cultură după 96 ore)	Greutatea micheliului uscat (g/l , după 96 ore)
$(NH_4)_2SO_4$	4,0	12,6
NH_4Cl	6,0	11,5
NH_4NO_3	22,0	13,0
$NaNO_3$	10,2	13,0
Uree	4,0	12,0
Peptonă	3,0	12,0
Triptonă	3,2	6,0
Acid aspartic	4,3	6,0
Acid glutamic	5,1	6,6

În aceeași cultură a fost determinată și influența sărurilor minerale (tabelul 16.4). În cazul acestei tulpini prezența ionilor de Fe^{2+} și Mg^{2+} favorizează producerea lipazei. Concentrațiile optime determinate au fost 0,1% pentru $FeSO_4$ și 0,04% pentru $MgSO_4$. Ionii de K^+, Na^+, Ca^{2+} nu influențează randamentul în enzimă.

Tabelul 16.4

Efectul sărurilor minerale asupra randamentului în lipază și al creșterii micheliului de *A.niger* în culturi submerse

Sarea minerală	Activitatea lipazică (unități/5ml mediu de cultură după 96 ore)	Greutatea micheliului uscat (g/l , după 96 ore)
KCl	2,9	3,5
NaCl	3,1	4,0
K_2SO_4	3,2	4,2
Na_2SO_4	3,0	4,5
$CaCl_2$	3,5	3,9
$MgSO_4$	5,6	10,5
$MgCl_2$	4,5	8,2
$FeSO_4$	7,2	6,5
Mediu de control *	3,0	3,8

*Conținând zaharoză, ulei de măsline, $(NH_4)_2PO_4$ și acetat de amoniu.

BCU IAȘI / CENTRU UNIVERSITAR

B.C.U. "M. Eminescu" IAŞI

Necesitatea utilizării unei surse de fosfat în mediul de cultură nu este menţionată decât rareori în literatura de specialitate, fiind indicat fosfatul de amoniu monoacid. În cazul acestei tulpini de *A.niger*, însă, prezenţa KH_2PO_4 în concentraţie de 0,2% duce la obţinerea de randamente mai bune decât cele obţinute cu $(NH_4)_2HPO_4$.

Influenţa aerării. Cercetările au evidenţiat creşterea producerii de lipază în cazul culturilor aerate pentru majoritatea microorganismelor producătoare de lipază, însă gradul de aerare necesar pare să difere de la o specie la alta. S-a constatat accelerarea dezvoltării celulelor şi a producerii de lipază în culturi agitate de *Penicillium species, Rhizopus species* şi *Geothricum species*. În cazul lipazei din *Mucor mucedo*, activitatea lipazei pentru culturi în flacoane agitate a fost mai mare cu 40% decât în cazul flacoanelor neagitate. Efectul aerării nu este însă întotdeauna pozitiv asupra producţiei de lipază. S-a constatat, de exemplu, că în cazul culturilor de *Pseudomonas fragi* aerarea intensă determină reducerea activităţii lipazice. În cazul microorganismelor *Candida lipolytica, Pseudomonas fragi* şi *Pseudomonas fluorescens* s-a observat că utilizând culturi agitate se obţine o creştere mai pronunţată a celulelor şi în faza iniţială o creştere a producţiei de lipază, urmată însă de o scădere rapidă a activităţii lipazice în cazul continuării agitării.

Influenţa fazei de dezvoltare a celulelor. Un alt factor important este relaţia dintre creşterea celulei şi formarea lipazei în timpul cultivării microorganismelor. Majoritatea cercetărilor au demonstrat că cea mai mare cantitate de lipază se produce în timpul fazei logaritmice de creştere, de exemplu în cazul microorganismelor *Acinetobacter species, Rhizopus arrhivus, Pseudomonas fragi* şi *Pseudomonas aeruginosa.*

Unii cercetători au arătat însă că în anumite cazuri eliberarea lipazei în mediul de cultură începe la sfârşitul fazei logaritmice de creştere şi acumularea enzimei are loc în timpul fazei staţionare. Astfel este cazul culturilor de *Pseudomonas fluorescens*, la care activitate lipazică în mediu s-a detectat doar după 4 – 5 zile de incubare.

16.1.3. Purificarea şi caracterizarea lipazelor microbiene

Majoritatea enzimelor obţinute prin izolare din ţesuturi vegetale sau animale sau din culturi microbiene trebuie purificate până la eliminarea enzimelor care pot cataliza reacţii secundare nedorite.

În cazul enzimelor extracelulare, cum sunt majoritatea lipazelor microbiene, care sunt secretate în mediul de cultură după terminarea fermentaţiei, microorganismele se separă de mediu prin centrifugare sau filtrare. Soluţia

rezultată poate fi uneori concentrată pentru a nu se manipula volume prea mari. Pentru aceasta se pot folosi membrane de ultrafiltrare.

Următoarea etapă este separarea diferitelor proteine prin precipitare fracționată. Se știe că distribuția resturilor hidrofobe și hidrofile la suprafața moleculei de proteină influențează puternic solubilitatea ei în diferiți solvenți. Capacitatea de solvatare a diferitelor proteine de către apă poate fi modificată în sensul reducerii solubilității prin schimbări de *p*H, tărie ionică, adăugare de solvenți organici miscibili cu apa, de alte substanțe dizolvate sau prin combinarea acestor metode, împreună cu modificarea temperaturii.

Principalele tehnici utilizate în cazul lipazelor sunt:

- precipitarea selectivă cu ajutorul sărurilor neutre;
- precipitarea fracționată, cu ajutorul solvenților organici miscibili cu apa, cum ar fi etanolul sau acetona;
- gel-filtrarea;
- cromatografia de interacțiune hidrofobă;
- cromatografia de afinitate.

O problemă foarte importantă care apare în cursul purificării enzimelor este pierderea de activitate datorită diferiților factori: denaturarea proteinei enzimatice, concentrația prea scăzută a proteinei, inactivarea centrului catalitic activ (reversibilă sau ireversibilă), degradarea enzimei produsă de proteazele din mediu. Pentru stabilizarea soluțiilor enzimatice, în afară de sulfatul de amoniu pot fi utilizați și alți compuși cum ar fi glicerina care are și avantajul că permite conservarea la temperaturi sub 0°C, fără a congela enzima.

O investigare calitativă a enzimelor prezente într-un preparat tehnic comercial de lipază din *Aspergillus niger*, conținând 55% proteină, a evidențiat prezența și a următoarelor enzime: esterază, protează, amilază, endo-1,4-β-glucanază, xilanază, pectinmetilesterază, poligalacturonază, catalază, β-D-glucozidază și β-D-galactozidază. Pentru purificare, soluția enzimei brute rezultate după ultrafiltrare s-a supus cromatografiei de schimb ionic pe DEAE – Trisacril M. Fracțiunile cu activitate lipazică s-au concentrat prin ultrafiltrare și s-au purificat în continuare prin gel-filtrare pe *Sephadex 650*. S-au obținut două izoenzime notate lipază I și lipază II, constatându-se dispariția activității glucozidazice și galactozidazice. Eliminarea impurităților rămase s-a făcut prin cromatografie hidrofobă pe *Phenylsepharose CL-4B* și recromatografiere pe același gel în condiții diferite. După această purificare s-a constatat, prin focusare izoelectrică, obținerea unor lipaze omogene. Lipazele I și II au puncte izoelectrice diferite, la 4,0 și respectiv 3,5. Masele moleculare determinate prin gel-filtrare au fost de 31 000 și respectiv 19 000 daltoni, iar *p*H-ul optim s-a situat pentru ambele între 5 și 6, rămânând însă active și la *p*H = 7 – 8.

16.2. APLICAȚII ALE LIPAZELOR MICROBIENE

Obiectivul major în industria de uleiuri şi grăsimi este producerea unor tipuri de trigliceride cu proprietăți de topire dorite. În acest sens se utilizează interesterificarea catalizată de lipaze a trigliceridelor disponibile. Acest potențial tehnologic al lipazelor a fost preconizat de Macrae şi echipa de cercetare Unilever ca o posibilitate a aplicării lipazelor în medii apoase în scopuri industriale.

Una din realizările cruciale ale colectivului de la Unilever a fost obținerea unor preparate imobilizate de lipaze cu specificitățile dorite. Un astfel de produs, *Lipozyme*, este disponibil azi în cantități industriale, iar în prezent se fac cercetări pentru realizarea unor noi preparate de lipaze imobilizate. Multe cercetări recente se ocupă cu diferite aspecte ale îmbunătățirii biocatalizatorilor pentru procesele Unilever, inclusiv noi tipuri de suporturi, lipaze modificate chimic solubile în solvenți organici şi lipaze fixate pe polimeri hidrofobi.

Procesul de interesterificare catalizat de lipaze se preconizează a fi de largă utilitate în industria farmaceutică şi alimentară.

Aplicarea lipazelor ca aditivi pentru detergenți pentru facilitarea scoaterii grăsimilor din țesături în timpul procesului de spălare este astăzi cea mai importantă aplicare a lipazelor. Pentru a fi fezabile, prețul lipazelor pentru detergenți trebuie să fie la nivelul altor enzime destinate industriei de detergenți. Mai mult, o lipază utilizabilă în producția de detergenți trebuie să fie stabilă şi activă în prezența proteazelor, cel puțin în timpul perioadei de spălare. Cu toate acestea, în 1988 s-a scos pe piață lipaza pentru detergenți *Lipolase*. Acest produs este obținut în mod curent utilizând o tulpină de *Aspergillus oryzae* în genul căreia a fost inserată o genă pentru lipază.

BCU IAŞI / CENTRU VECHI

17 GLUCOZOXIDAZA

17.1. GENERALITĂȚI. OXIDAREA ENZIMATICĂ A GLUCOZEI

Glucozoxidaza se cunoaşte încă din anul 1904, când s-a demonstrat posibilitatea oxidării glucozei cu un extract de *Aspergillus niger*.

Datorită importanței sale comerciale mai mici, această enzimă a fost mai puțin studiată, neatrăgând atenția ca alte enzime, cum ar fi glucozizomeraza de exemplu. Abia în 1975, Scott întocmeşte o lucrare de sinteză în legătură cu proprietățile de bază ale enzimei. Glucozoxidaza este produsă de diferite microorganisme, în special de fungi, la care proprietățile enzimei variază în funcție de specia producătoare.

Glucozoxidaza, numită şi β-D-gluco-piranoz-dehidrogenază sau β-D-glucozo-oxigen-1-oxidoreductază (E.C. 1.1.3.4) este o flavoproteină care conține 1 mol proteină, 2 moli flavinadenin-dinucleotidă (FAD) şi are o greutate moleculară de 152 000–192 000 Da, în funcție de sursa din care a fost izolată. Această enzimă are o stabilitate maximă la *p*H între 3,5 şi 8,0, iar curbele ei de activitate sunt funcție de *p*H pentru enzimele izolate din mai multe genuri de microorganisme şi prezintă o porțiune aproape plată între *p*H 4,5 şi 7.

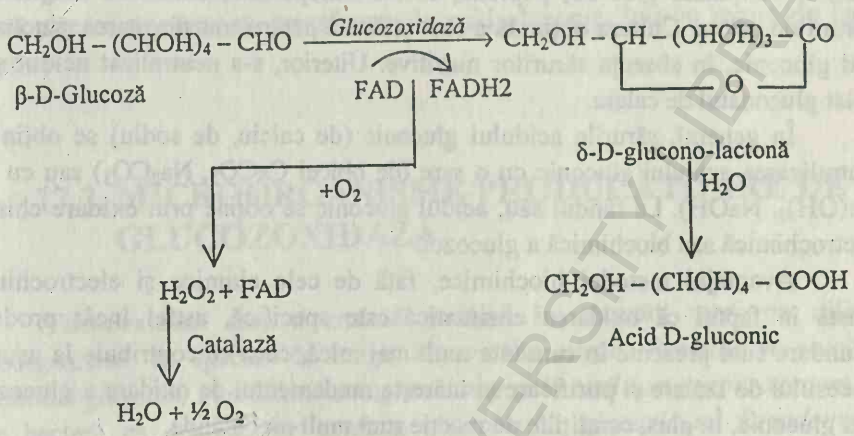
De exemplu, glucozoxidaza obținută din *Aspergillus niger* are masa moleculară 160 000 Da, optimum de activitate între 5,5 şi 6,5 şi punctul izoelectric situat la *p*H = 4,02.

Glucozoxidaza este o enzimă înalt specifică, ce oxidează cu viteză mare forma β-D-a glucozei. Oxidarea glucozei este însă cantitativă datorită faptului că glucozoxidaza este însoțită de obicei de aldozmutarotază (E.C. 5.1.3.3), care restabileşte în permanență echilibrul α-D-glucoză → β-D-glucoză.

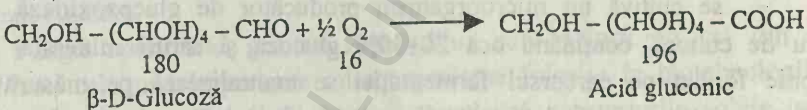
Oxidarea glucozei are loc cu formare de D-glucono-1,5-lactonă şi apă oxigenată.

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

În preparatele brute şi în cele puţin purificate, glucozoxidaza este însoţită de catalază care descompune apa oxigenată în apă şi oxigen, care participă din nou în reacţie.



Astfel, reacţia globală devine:



Specificitatea glucozoxidazei este foarte mare, forma β a glucozei fiind oxidată de 160 ori mai rapid decât forma α.

Referitor la substrat, Pazur şi Kleppe (1965) au arătat că numai 2-deoxy-D-glucoza şi 6-deoxy-D-glucoza mai sunt oxidate de glucozoxidază cu o viteză de numai 10% din cea de oxidare a D-glucozei.

Glucozoxidaza este enzima care catalizează reacţia de oxidare a glucozei la acid gluconic. Obţinerea acidului gluconic prin biosinteză şi a sărurilor sale (de Ca, Na, Mg, Fe etc) presupune, mai întâi, obţinerea glucozoxidazei şi apoi transformarea enzimatică a glucozei în acid gluconic. Procedeul nu implică însă obţinerea enzimei într-o formă purificată, fiind suficientă prezenţa acesteia în lichidul de cultură sau în biomasa produsă special în acest scop.

Formarea acidului gluconic prin oxidarea microbiologică a glucozei a fost comunicată prima dată de Boutroux acum 110 ani. El a observat că o cultură de *Acetobacter aceti* transformă glucoza într-un acid nevolatil care la început a fost considerat drept acid lactic şi apoi identificat a fi acid gluconic.

În anul 1922, Molliard a constatat formarea acidului gluconic prin oxidarea zaharozei prin intermediul unui mucegai *Aspergillus niger*. Ulterior, Bernhauer a izolat o tulpină de *Aspergillus niger* care avea capacitatea de a produce acid

gluconic, respectiv gluconat de calciu, cu randament ridicat, prin oxidarea glucozei, în prezența carbonatului de calciu. El a elaborat un proces de obținere a gluconatului de calciu în două trepte: microorganismul a fost cultivat pe un mediu nutritiv, conținând glucoză, peptonă, fosfat nanopotasic, sulfat de magneziu și clorură de calciu. Cultura obținută a fost utilizată pentru transformarea glucozei în acid gluconic, în absența sărurilor nutritive. Ulterior, s-a neutralizat acidul și s-a izolat gluconatul de calciu.

În general, sărurile acidului gluconic (de calciu, de sodiu) se obțin prin neutralizarea acidului gluconic cu o sare (de obicei $CaCO_3$, Na_2CO_3) sau cu baze ($Ca(OH)_2$, NaOH). La rândul său, acidul gluconic se obține prin oxidare chimică, electrochimică sau biochimică a glucozei.

Avantajul metodei biochimice, față de cele chimice și electrochimice, constă în faptul că oxidarea enzimatică este specifică, astfel încât produsele secundare sunt prezente în cantitate mult mai mică, ceea ce contribuie la ușurarea procesului de izolare și purificare și mărește randamentul de oxidare a glucozei la acid gluconic. În plus, condițiile de reacție sunt mult mai blânde.

Oxidarea biochimică a glucozei la acid gluconic poate avea loc în două moduri:

– se cultivă un microorganism producător de glucozoxidază, pe un mediu de cultură, conținând cca 20–30% glucoză și săruri minerale. Acidul gluconic format pe parcursul fermentației se neutralizează pe măsură ce se formează pentru a împiedica cristalizarea gluconatului respectiv. La sfârșitul bioprocesului se separă biomasa, obținându-se o soluție nativă conținând un amestec de acid gluconic și sarea acestuia (de Ca, Na etc.). În această variantă de lucru, concentrația inițială mare a glucozei conduce la formarea unei cantități mici de biomasă, dar aceasta posedă o activitate glucozoxidazică suficientă pentru a produce oxidarea glucozei din mediul de cultură. Acest mod de oxidare a glucozei, în prezența celulelor unui microorganism, se numește *oxidare microbiologică a glucozei*;

– se cultivă un microorganism producător de glucozoxidază, pe un mediu de cultură specific producției de enzimă, conținând cca 5–10% glucoză și săruri minerale. În acest caz, se dezvoltă o cantitate mare de biomasă cu activitate glucozoxidazică. La sfârșitul fermentației se separă biomasa și se prelucrează în scopul extracției glucozoxidazei. Preparatele de glucozoxidază, cu diferite grade de puritate, pot fi utilizate, ulterior, la oxidarea unor soluții de glucoză de diferite concentrații. În acest caz, procesul de oxidare a glucozei cu ajutorul enzimei eliberate de microorganism se numește *oxidarea enzimatică a glucozei*.

Oxidarea glucozei la acid gluconic, prin utilizarea de preparate de glucozoxidază imobilizată sau de glucozoxidază și catalază co-imobilizate pe diferite suporturi, permite realizarea procesului în bioreactoare cu regim de lucru

continuu. Aşa, de exemplu, dacă se tratează zahăr invertit sau sirop de glucoză cu o concentraţie mare în fructoză cu glucozoxidază, se obţine un amestec de fructoză şi acid gluconic care sunt uşor separate prin cromatografie pe schimbători de ioni, iar în condiţiile folosirii de glucozoxidază şi catalază co-imobilizate, siropul de glucoză este relativ uşor de transformat în acid gluconic, într-un regim de lucru continuu.

17.2. MICROORGANISME PRODUCĂTOARE DE GLUCOZOXIDAZĂ

Glucozoxidaza este o enzimă produsă în cantităţi mari de diferite microorganisme, în special de fungi: *Aspergillus niger*, *Penicillium notatum*, *Penicillium glaucum*, *Penicillium amagasakiense* şi *Penicillium purpuragenum* sau unele bacterii ca *Acetobacter oxydans*, *Acetobacter gluconicum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas ovalis*. Obţinerea şi izolarea glucozoxidazei din *A. niger* este cea mai eficientă, enzima produsă de tulpinile acestui microorganism fiind cel mai intens studiată.

Fungii aparţinând genului *Aspergillus* sunt alături de cei din genul *Penicillium*, cele mai importante microorganisme folosite în biotehnologiile de obţinere a enzimelor. Fungii filamentoşi invadează substraturile solide, secretă enzime degradative, conducând în cele din urmă la descompunerea şi transformarea substratului pe care se dezvoltă. Din punct de vedere taxonomic, fungii, microorganisme eucariote, pot fi încadrate după clasificarea dată în "Biology of Industrial Microorganisms" de A.L.Demain şi N.A. Solomon (1985) în:

- diviziunea *Anastigomycotina*;
- subdiviziunea *Deuteromycotina*;
- clasa *Deuteromycetes*;
- subclasa *Hypomycotidae*;
- ordinul *Moniliales*;
- familia *Moniliaceae*;
- genul *Aspergillus*.

Majoritatea speciilor din genul *Aspergillus* prezintă miceliu septat, au un ciclu de viaţă sexuat şi sunt denumiţi în mod obişnuit "fungi imperfecţi". Unii autori îi încadrează şi la fungi perfecţi datorită prezenţei ciclului de viaţă parasexual. Acesta este un ciclu ambiguu, asemănător cu cel sexual, în special în etapa de recombinare a materialului genetic, cu menţiunea că recombinarea nu are loc în meioză ci în cursul diviziunii mitotice.

Figura 17.1 prezintă schematic structura aparatului conidial asexuat. Conidioforii sunt formaţiuni verticale care iau naştere din miceliu vegetativ sau, altfel spus, reprezintă nişte hife alungite care au o extremitate superioară globulară, multinucleată şi o extremitate inferioară neseparată de celula-mamă, denumită celulă bazală. Conidioforul este format din celula de bază, tulpină şi veziculă. Pe veziculă sunt dispuse unul sau două rânduri de celule fertile denumite sterigme.

Celulele fertile pot acoperi fie parţial, fie integral suprafaţa veziculei.

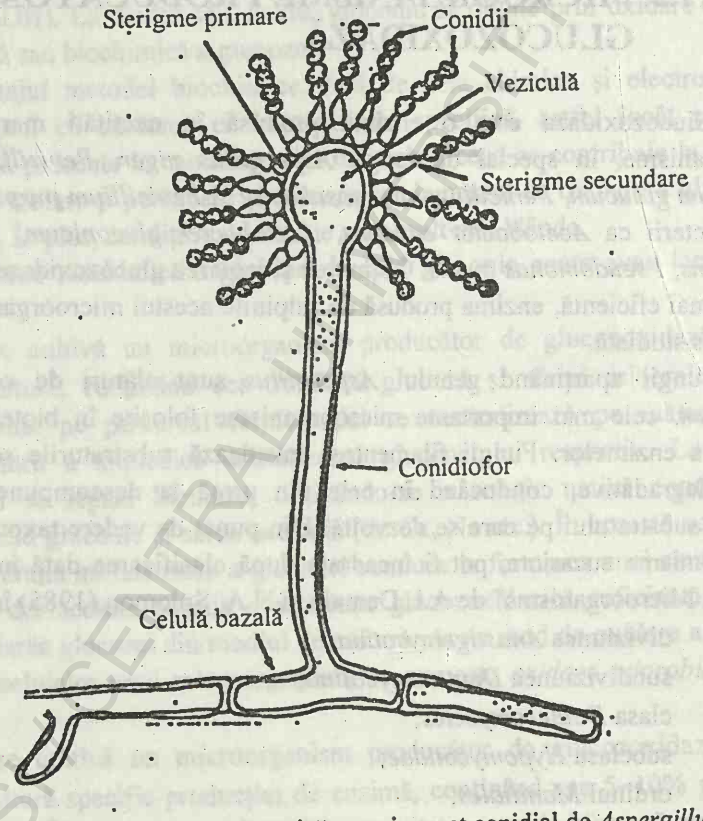


Fig.17.1. Reprezentarea schematică a unui aparat conidial de *Aspergillus*.

Nucleii sterigmelor se divid mitotic şi migrează spre extremitate. Se formează apoi peretele despărţitor care separă nucleul sau nucleii de citoplasmă, diferenţiindu-se în entităţi conidiosporale mature. Procesul se repetă, conducând astfel la un şir lung de conidiospori. Întregul lanţ de conidii poartă zestrea genetică a sterigmelor. La speciile cu spori uninucleaţi, lanţul de conidii formează o clonă.

Prin cultivare pe mediu Czapek-agarizat, la temperatura de 26°C, se formează după 2 săptămâni colonii, având un diametru de 3,0 – 4,5 cm, uşor

încreţite radiar, constând dintr-un miceliu bazal alb, care la majoritatea tulpinilor se extinde cu 0,2 – 1 cm în afara ariei centrale a coloniei foarte abundent sporulată şi care formează o zonă de miceliu alb cu margini neregulate şi textură granulară. Colonia nu formează exsudat şi prezintă un miros slab caracteristic. Conidioforii sunt mai abundenţi în zona centrală a coloniei, iar culoarea conidiilor variază de la brun deschis la negru. Lungimea conidioforilor este de obicei de 1,0 – 2,5 – 4 mm şi 10 – 20 mm în diametru, adesea subţiaţi chiar sub vezicură. Vezicula globuloasă are 45 – 60/80 – 85 μ în diametru. Sterigmele primare sunt rotunde, iar cele secundare sunt alungite. Conidiile sunt globuloase, netede şi devin la maturitate rugoase. Tulpinile din genul *Aspergillus* produc metaboliţi secundari. Dintre metaboliţii produşi de tulpinile din genul *Aspergillus*, cei mai importanţi pentru industrie sunt acidul citric, acidul gluconic, acidul malic, acidul tartric şi oxalic. Reprezentanţii genului *Aspergillus* produc, de asemenea, numeroase enzime: amilaze, catalaze, glucoamilaze, glucoxidaze, lactaze, pectinaze şi proteaze.

17.3. BIOCINETICA PRODUCERII GLUCOZOXIDAZEI ÎN CULTURILE CU TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER*

Cercetări de obţinere a glucozoxidazei au fost efectuate, la noi în ţară, în cadrul Institutului de Cercetări Alimentare, Facultăţii de Chimie Alimentară Galaţi, sub conducerea Prof. Sorin Vasu şi, de asemenea, în cadrul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice Bucureşti, unde s-a elaborat o tehnologie de obţinere a gluconatului de calciu, aplicată industrial (M.Vociu, 1958) şi s-a pus la punct o tehnologie de obţinere a glucozoxidazei purificate, din tulpini de *Aspergillus niger* (Jurcoane şi colab., 1986), brevetată ulterior.

Aşa cum s-a arătat, microorganismele bune producătoare de glucozoxidază sunt considerate fungii din genul *Aspergillus*. Aceste microorganisme pot fi cultivate în condiţii de laborator şi de pilot industrial (sau în fermentatoare de diferite tipuri), cu o dezvoltare rapidă pe medii lichide. Prezintă o sporulare intensă pe medii solide şi sintetizează rapid glucozoxidaza intracelulară. În plus, coloniile sunt viguroase şi rezistente la infecţii cu microorganisme străine.

În continuare, prezentăm procedeul de obţinere şi purificare a glucozoxidazei cu o tulpină de *Aspergillus niger* var. *phoenicis*, elaborat şi brevetat de colectivul ICCF în anul 1995 (Jurcoane şi colab.).

În scopul obținerii glucozoxidazei, s-a folosit ca microorganism producător o tulpină de *Aspergillus niger* var. *phoenicis* înregistrată în colecția de microorganisme a Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice sub nr.19 sau tulpina *Aspergillus niger* MIUG 55, din colecția Facultății de Chimie Alimentară din Universitatea Galați.

17.3.1. Întreținerea și conservarea tulpinilor de *A. niger*

Pentru păstrarea viabilității și a potențialului de biosinteză a producătorilor de metaboliți importanți pentru industrie, este necesară aplicarea unor metode adecvate de conservare. Tulpinile producătoare de glucozoxidază au fost conservate sub formă vegetativă și liofilizată.

Tulpinile de lucru *A.niger* se păstrează sub formă de conserv vegetativ, ca subculturi pe mediu cu extract de malț agarizat 2% în tuburi înclinate incubate la 30...31°C în frigider la +4°C. Pasajele solid-solid se fac lunar, selecționându-se totodată culturile cu dezvoltarea cea mai bună și eliminându-se tuburile de culturi atipice, slab crescute

Pentru conservarea pe timp îndelungat a microorganismelor se utilizează metoda clasică de liofilizare. Liofilizarea sau uscarea prin frig a devenit în ultimele decenii cea mai comună tehnică pentru conservarea pe timp îndelungat a ciupercilor.

Tulpina de *Aspergillus niger* introdusă în lucru este mai întâi activată prin treceri succesive pe mediu cu extract de malț agarizat cu următoarea formulă:

- extract de malț 2%;
- agar-agar 2%;
- apă 100 ml;
- *p*H-ul mediului se ajustează la valoarea 6,4 corectat cu o soluție NaOH 40%.

După preparare, mediul se repartizează în eprubete și se sterilizează la 110°C, timp de 30 min. După verificarea sterilității mediului prin menținerea sa la termostat la 37°C, timp de 48 ore, acesta se însămânțează cu suspensia de spori din fiola de liofilizare.

Eprubetele cu mediu însămânțat sunt incubate la 30...31°C, timp de 7 zile. La sfârșitul perioadei de incubare, eprubetele sunt examinate în privința gradului de sporulare al culturii precum și a purității acesteia. Eprubetele cu culturi corespunzătoare se selecționează în vederea lucrărilor ulterioare, fiind conservate la frigider (+4°C). Acestea constituie cultura de întreținere.

17.3.2. Prepararea inoculului pe mediu solid

Inoculul pe mediu solid se obţine pornind de la cultura vegetativă de *A.niger* MIUG 55, sau *A.niger* ICCF-19 care serveşte ca material de însămânţare a mediului.

Mediul de inocul solid se prepară din 2% extract de malţ, 2% agar-agar completat la 100 ml apă comună. Se corectează *p*H-ul mediului la 6,4 cu NaOH 40%.

Mediul astfel preparat în flacoane Erlenmeyer de 750 ml, se sterilizează la 110°C timp de 30 min, se răceşte şi apoi se menţine timp de 24–28 ore la 37°C pentru evaporarea condensului format. Mediul de cultură se însămânţează cu 2 ml suspensie de spori obţinută prin adăugarea a 10 ml de apă distilată sterilă peste cultura de întreţinere bine sporulată. După însămânţare, suspensia de spori se împrăştie uniform pe întreaga suprafaţă a mediului, care se incubează la termostat, la temperatura de 30...31°C, timp de 7 zile pentru sporulare. După această perioadă, sporii se pot utiliza imediat sau se pot conserva la frigider la +4°C. Cultura de inocul pe mediu solid, bine sporulată, serveşte la însămânţarea mediului de fermentaţie.

17.3.3. Dezvoltarea inoculului vegetativ

Inoculul vegetativ din cultura de *Aspergillus niger* serveşte ca material de însămânţare a mediului de fermentaţie utilizat în obţinerea biomasei miceliene îmbogăţită în glucozoxidază.

Mediul de cultură pentru obţinerea inoculului vegetativ conţine în g la 100 ml apă: glucoză (dextroză) 6 (ca substanţă reducătoare), carbonat de calciu 1, azotat de sodiu 1, sulfat de magneziu 0,05, fosfat monopotasic 0,05, fosfat bipotasic 0,05, clorură de potasiu 0,05, *p*H-ul mediului înainte de sterilizare 6–6,5 şi se sterilizează la 110°C, 20 min. Inoculul se dezvoltă în condiţii de agitare şi aerare continuă, timp de 26–30 de ore.

17.3.4. Faza de bioproces

Pentru faza de regim, se prepară un mediu de cultură având în compoziţie: glucoză 8% (ca substanţă reducătoare), azotat de sodiu, fosfat monopotasic, sulfat de magneziu, fosfat diamoniacal, peptonă, $CaCO_3$.

În faza de bioproces, lucrările s-au efectuat în sistem submers în bioreactoare de 150 l capacitate totală, încărcate cu 70 l mediu de cultură.

Prepararea mediului de biosinteză se face astfel: se dizolvă mai întâi glucoza în apă încălzită la 60...70°C şi apoi se adaugă sărurile (fără carbonat de calciu), ulei vegetal (ca antispumant). Mediul astfel preparat se introduce în bioreactor (sterilizat în prealabil) şi se sterilizează timp de 20 min, la 110°C.

Carbonatul de calciu se suspendă separat în 5000 ml apă potabilă şi se sterilizează în flacoane Erlenmeyer (câte 500 g $CaCO_3$ pe flacon de 750 ml) la 120°C, timp de o oră.

Mediul de biosinteză sterilizat şi răcit la 35°C se însămânţează fie cu o suspensie de spori (aproximativ 500 ml) colectată de pe 5 flacoane Erlenmeyer cu suprafaţă de spori (inocul pe mediu solid dezvoltat în laborator), fie cu 7 litri mediu de inocul vegetativ pregătit cum s-a arătat anterior.

În momentul însămânţării se introduce în bioreactor şi suspensia de carbonat de calciu sterilă, bine agitată, reprezentând 20% din cantitatea totală necesară (un flacon cu 500 g $CaCO_3$). Restul de $CaCO_3$ se adaugă pe parcursul bioprocesului, în cazul în care scade *p*H-ul.

După inoculare, se stabileşte regimul de lucru şi anume:

- presiunea în vas: 1 bar;
- debitul de aer: 0,7 l aer/l mediu/min;
- turaţia agitatorului: 280 rot/min;
- temperatura: 35°C;
- *p*H = 5.

Pentru urmărirea bioprocesului, se scot probe de mediu din 8 în 8 ore şi se determină:

- concentraţia glucozei;
- *p*H-ul;
- aspectul microorganismului;
- gluconatul de calciu;
- activitatea glucozoxidazică a mediului;
- activitatea glucozoxidazică a miceliului.

Dacă *p*H-ul scade sub valoarea 4, se adaugă câte un flacon cu $CaCO_3$ pentru corecţie.

Se trasează curba scăderii concentraţiei glucozei. Când aceasta intră în faza asimptotică, atingând valoarea 1–1,2 % în mediu, bioprocesul se întrerupe. Fermentaţia durează 36–40 de ore din momentul însămânţării.

Variaţia parametrilor biochimici, pe parcursul biosintezei glucozoxidazei, se poate urmări în figura 17.2.

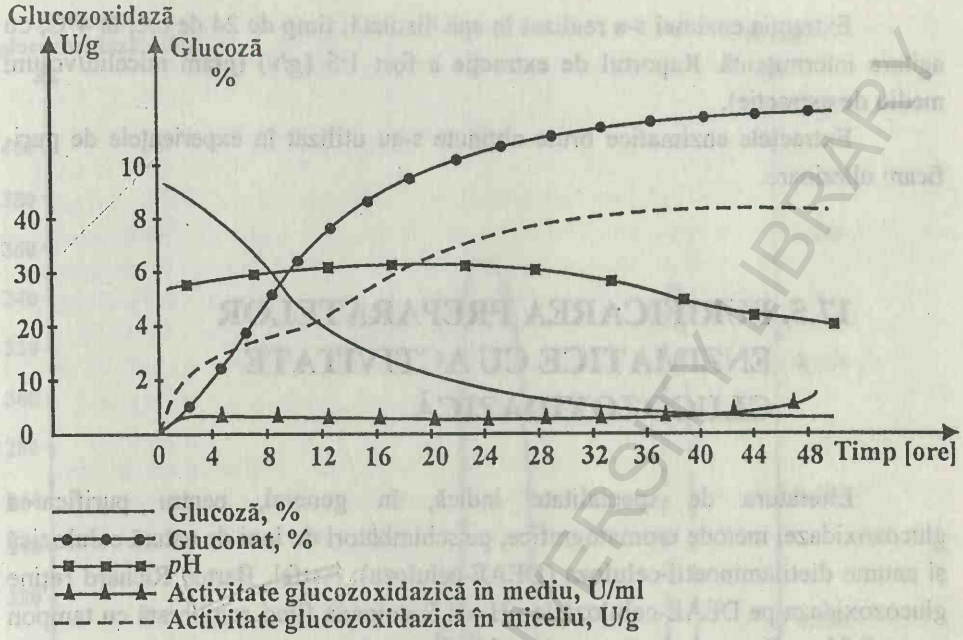


Fig.17.2. Biocinetica producerii glucozoxidazei cu tulpina *Aspergillus niger* ICCF.

17.4. EXTRACȚIA ȘI IZOLAREA GLUCOZOXIDAZEI DIN MICELII DE *ASPERGILLUS NIGER*

Glucozoxidaza este o enzimă intracelulară, astfel încât după biosinteză cu tulpini de *Aspergillus niger* se impune necesitatea separării biomasei cu activitate glucozoxidazică din mediul de fermentație.

Este cunoscut faptul că separarea biomasei fungice nu ridică probleme deosebite, astfel că filtrarea sub vacuum, pe strat de Perlită (adjuvant de filtrare), se desfășoară în bune condiții. Miceliul se spală de pe filtru cu două volume (vol/vol) apă distilată raportată la volumul de mediu filtrat.

Miceliul separat din lichidul de cultură prin filtrare și spălat cu apă distilată este supus operației de spargere a pereților celulari în vederea eliberării enzimei.

Descriem în continuare procedeul de extracție și purificare a glucozoxidazei stabilit de colectivul Institutului de Cercetări Chimico-Farmaceutice București (Jurcoane și colab.).

Pentru spargerea pereților celulari, miceliul umed a fost prelucrat prin mojarare cu nisip de cuarț în raport 1: 0.3 (*g/g*) timp de 30 min.

Extracția enzimei s-a realizat în apă distilată, timp de 24 de ore, la 4°C, cu agitare intermitentă. Raportul de extracție a fost 1:5 (*g/v*) (gram miceliu/volum mediu de extracție).

Extractele enzimatice brute obținute s-au utilizat în experiențele de purificare ulterioare.

17.5. PURIFICAREA PREPARATELOR ENZIMATICE CU ACTIVITATE GLUCOZOXIDAZICĂ

Literatura de specialitate indică, în general, pentru purificarea glucozoxidazei metode cromatografice, pe schimbători de ioni de natură celulozică și anume dietilaminoetil-celuloza (DEAE-celuloza). Astfel, Barton Richard reține glucozoxidaza pe DEAE-celuloză la *p*H = 4,5, coloana fiind echilibrată cu tampon acetat 0,05 m. Pentru îndepărtarea impurităților, coloana s-a eluat cu tampon acetat 0,01 m la *p*H = 4,5. Pentru a elua glucozoxidaza de pe coloană, s-a utilizat un tampon acetat 0,1 n la *p*H = 3,7.

Redăm în continuare modul de purificare a glucozoxidazei obținute prin extracție din biomasă micelian de *Aspergillus niger*, prin adsorbție pe DEAE-Sephacel (varietate de DEAE-celuloză cu dimensiunea porilor de 40–50 μm).

DEAE-Sephacel spălată în apă s-a amestecat cu 3 părți etanol 96%, s-a lăsat să sedimenteze, iar supernatantul alcool a fost decantat. S-a repetat spălarea cu NaOH 0,5 n, după care schimbătorul s-a spălat cu apă distilată până la neutralizare. Schimbătorul celulozic astfel pregătit a fost introdus într-o coloană 5 x 25 cm, fiind utilizată la adsorbția glucozoxidazei.

Soluția de glucozoxidază rezultată după filtrarea miceliului, reunită cu apa (1 volum) de spălare și concentrată de 5 ori, s-a filtrat pe hârtia de filtru bandă albastră și apoi s-a trecut pe coloana DEAE-Sephacel. Viteza de curgere a fost de 50 ml/oră. S-au colectat probe de 25 ml, în care s-a determinat activitatea glucozoxidazică, *p*H-ul și conținutul proteic. Eluția enzimei de pe coloană s-a efectuat cu soluție tampon acetat 1 m, *p*H = 3,5. S-au colectat probe de 25 ml cu viteza de 50 ml/h.

În probele recoltate, s-au determinat activitatea glucozoxidazică, *p*H-ul și conținutul în proteină.

În figura 17.3 se redă curba de eluție a glucozoxidazei de pe coloana cu DEAE-Sephacel (cu tampon acetat 1 m, *p*H = 3,5).

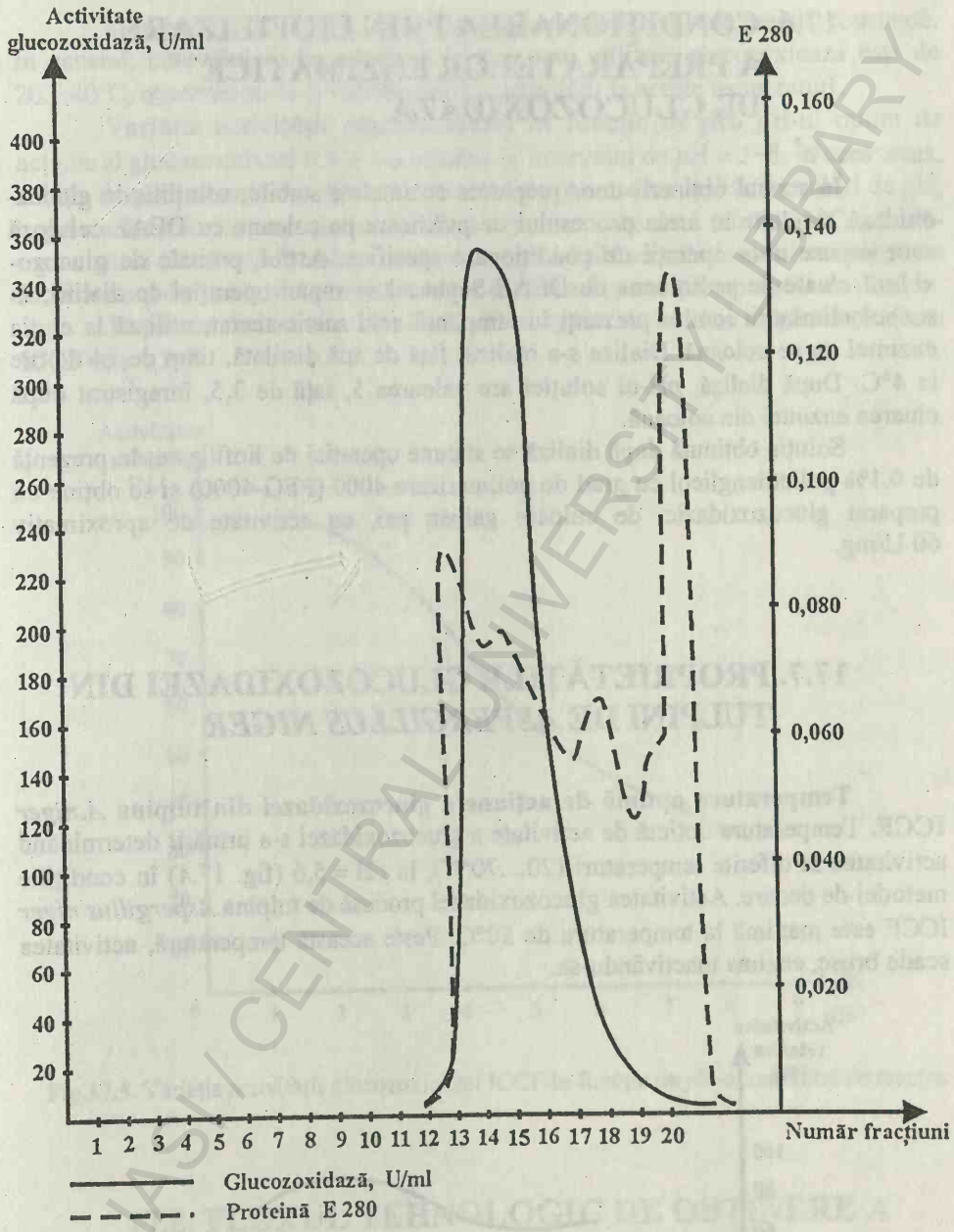


Fig. 17.3. Curba de eluție a glucozoxidazei de pe coloana cu DEAE-Sephacel (cu tampon acetat 1m, *p*H = 3,5).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17.6. CONDIȚIONAREA PRIN LIOFILIZARE A PREPARATELOR ENZIMATICE DE GLUCOZOXIDAZĂ

În scopul obținerii unor preparate enzimatice stabile, soluțiile de glucozoxidază rezultate în urma procesului de purificare pe coloane cu DEAE-celuloză sunt supuse unor operații de condiționare specifice. Astfel, probele de glucozoxidază eluate de pe coloana de DEAE-Sephacel se supun operației de dializă, în scopul eliminării ionilor prezenți în tamponul acid acetic-acetat, utilizat la eluția enzimei de pe coloană. Dializa s-a realizat față de apă distilată, timp de 24 de ore la 4°C. După dializă, *p*H-ul soluției are valoarea 5, față de 3,5, înregistrat după eluarea enzimei din coloană.

Soluția obținută după dializă se supune operației de liofilizare, în prezență de 0,1% polietilenglicol cu grad de polimerizare 4000 (PEG-4000) și se obține un preparat glucozoxidazic, de culoare galben pai, cu activitate de aproximativ 60 U/mg.

17.7. PROPRIETĂȚILE GLUCOZOXIDAZEI DIN TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER*

Temperatura optimă de acțiune a glucozoxidazei din tulpina *A.niger* ICCF. Temperatura optimă de activitate a glucozoxidazei s-a urmărit determinând activitatea la diferite temperaturi (20...70°C), la *p*H = 5,6 (fig. 17.4) în condițiile metodei de dozare. Activitatea glucozoxidazei produsă de tulpina *Aspergillus niger* ICCF este maximă la temperatura de 50°C. Peste această temperatură, activitatea scade brusc, enzima inactivându-se.

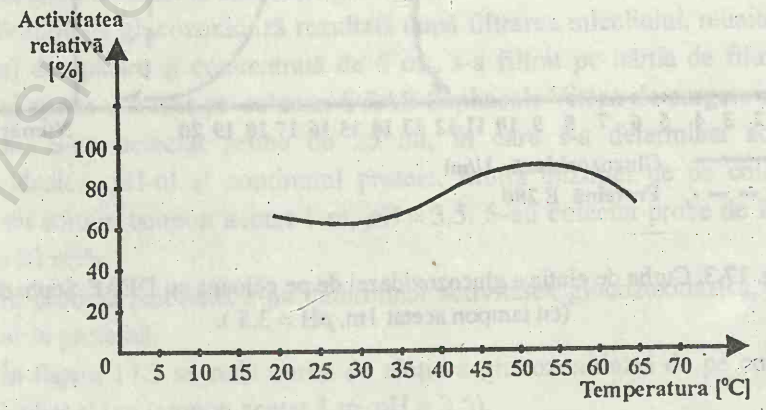


Fig.17.4. Curba de variație a activității glucozoxidazei ICCF în funcție de temperatură.

În intervalul 20...32°C, activitatea glucozoxidazică este practic constantă. În general, intervalul de temperatură la care este utilizată glucozoxidaza este de 20...40°C, observându-se o variație mică a activității la aceste temperaturi.

Variația activității glucozoxidazei în funcție de *p*H. *p*H-ul optim de acțiune al glucozoxidazei ICCF s-a urmărit în intervalul de *p*H = 3–8. În acest sens, soluția de glucoză care constituie substratul folosit s-a adus la diferite valori de pH, cuprinse în intervalul menționat, iar după o preincubare de 5 min la 35°C s-a adăugat enzima (dizolvată în soluții tampon de același *p*H cu soluția substratului) și s-a incubat timp de 2 min, determinându-se activitatea în condițiile metodei de dozare.

După cum reiese din fig. 17.5, *p*H-ul optim de acțiune al glucozoxidazei ICCF este 4,5–5.

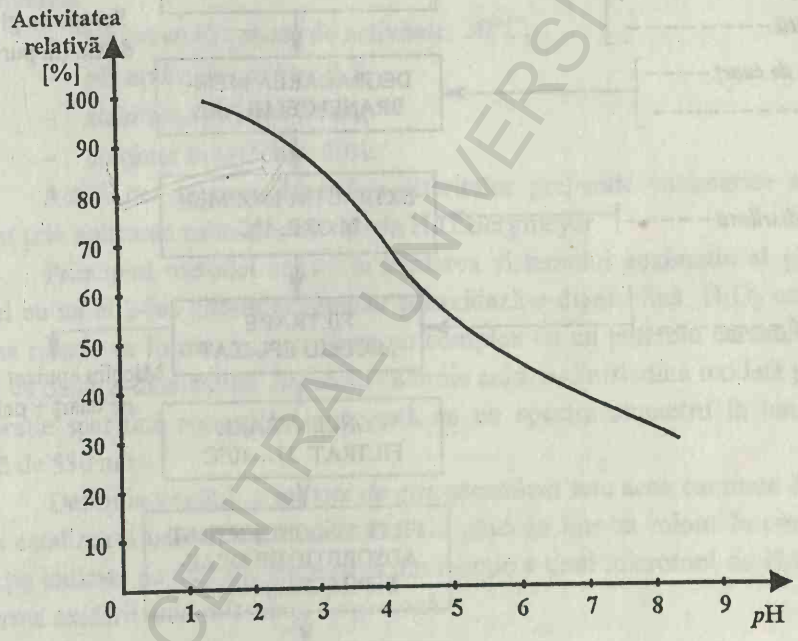


Fig.17.5. Variația activității glucozoxidazei ICCF în funcție de *p*H-ul mediului de reacție.

17.8. FLUXUL TEHNOLOGIC DE OBȚINERE A GLUCOZOXIDAZEI DIN TULPINI DE *ASPERGILLUS NIGER*

Etapele de obținere și purificare a glucozoxidazei prin biosinteză cu tulpini de *Aspergillus niger* pot fi urmărite în fig. 17.6.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

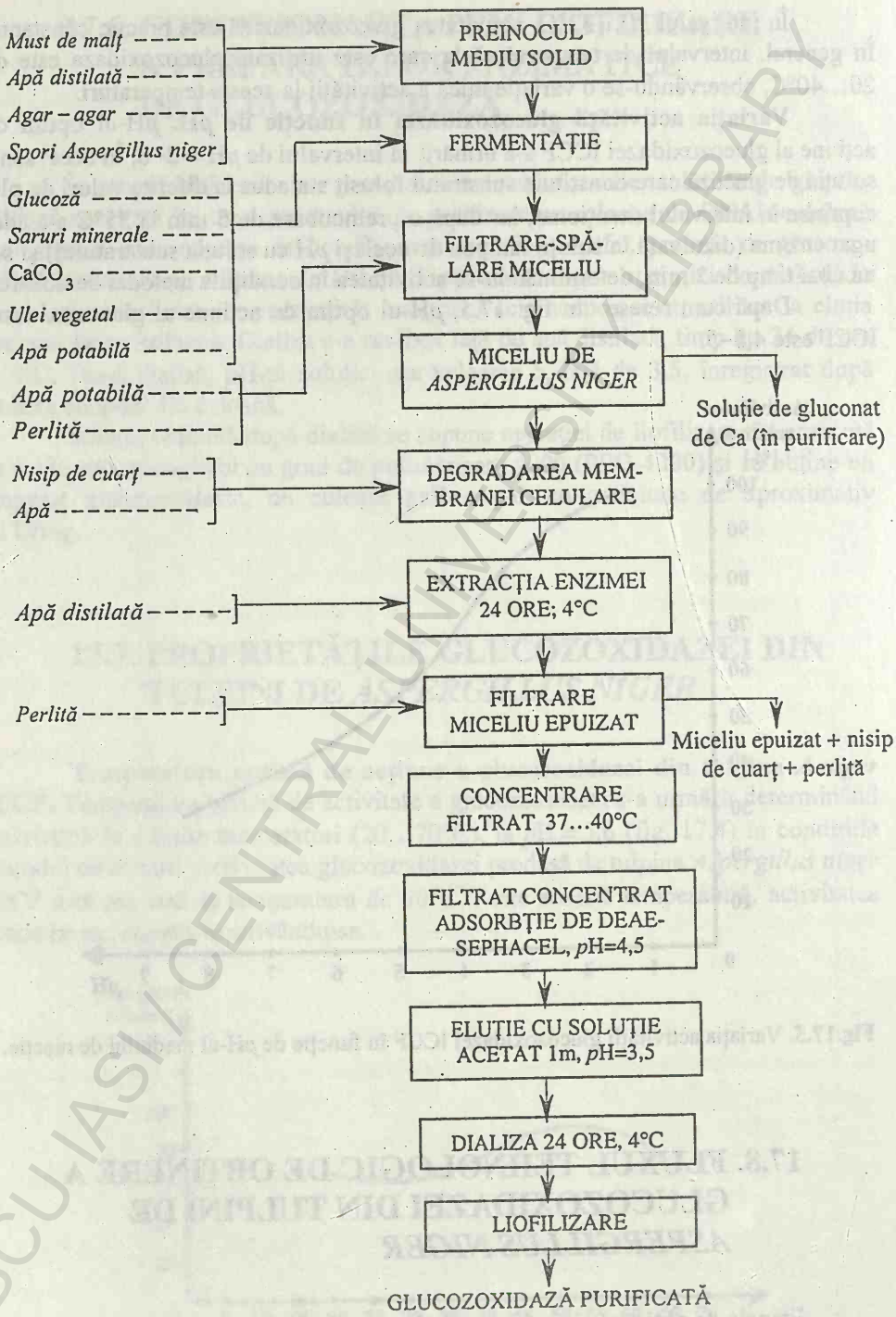


Fig. 17.6. Fluxul tehnologic de obţinere al glucozoxidazei.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

17.9. CARACTERISTICILE FIZICO-CHIMICE ŞI BIOCHIMICE ALE PREPARATULUI PURIFICAT DE GLUCOZOXIDAZĂ

Preparatul de glucozoxidază se prezintă sub formă de pulbere amorfă, de culoare galben deschis, fără gust, cu miros caracteristic. Activitatea preparatelor enzimatice glucozoxidazice obţinute de colectivul ICCF variază între 20 şi 60 U/mg.

Celelalte caracteristici biochimice ale preparatului de glucozoxidază sunt următoarele:

- temperatură optimă de activitate: 50°C;
- *p*H optim de acţiune: 4,5;
- stabilitate în timp: 6 luni;
- conţinut în proteine: 20%.

Activitatea glucozoxidazică a diferitelor preparate enzimatice s-a determinat prin aplicarea metodei descrise de H.U.Bergmeyer.

Principiul metodei constă în cuplarea sistemului enzimatic al glucozoxidazei cu un al 2-lea sistem enzimatic: peroxidază-*o*-dianisidină. H_2O_2 rezultat din prima reacţie va forma cu peroxidaza un complex cu un puternic caracter oxidant, care va oxida *o*-dianisidina. În mediu puternic acid, *o*-dinisiadina oxidată prezintă o coloraţie specifică roşu-violet, măsurată cu un spectrofotometru la lungimea de undă de 530 nm.

Definiţia unităţii: *o unitate de glucozoxidază* este acea cantitate de enzimă care catalizează oxidarea a 1 micromol de glucoză într-un minut în condiţiile de reacţie indicate de metodă. Eliberarea din reacţie a unui micromol de H_2O_2 are loc în urma oxidării unui micromol de glucoză.

17.10. DOMENII DE UTILIZARE A GLUCOZOXIDAZEI

Glucozoxidaza poate fi extrasă din micelii de *A. niger*, purificată şi utilizată în diferite domenii de activitate. Astfel, sub formă de preparate de diferite grade de puritate, glucozoxidaza se foloseşte în industria alimentară pentru eliminarea oxigenului din cutiile de conserve, din recipientele de bere îmbuteliată, fiind considerat cel mai bun antioxidant biochimic.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Preparatele de glucozoxidază purificată stabilizate sau imobilizate sunt utilizate ca reactivi analitici de înaltă specificitate în determinările glucozei din lichidele biologice sau din mediile de biosinteză.

Utilizarea glucozoxidazei (GOD) în metodele enzimatice de determinare a glucozei a condus la stabilirea unor tehnici foarte rapide şi exacte de dozare (teste de diagnostic, biosenzori).

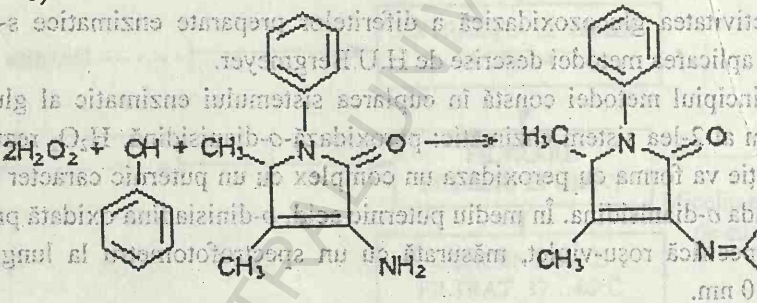
Numeroase metode folosesc determinarea H_2O_2 prin intermediul catalazei şi peroxidazei în prezenţa unor agenţi cromogeni [*o*-dianisidină, *o*-toluidina, *o*-fenilendiamina, 2,2-azino-di-(3-etil-benz-tiazolin-6-sulfonat), prescurtat ATBS etc.].

O metodă de dozare colorimetrică a glucozei este următoarea:

a) α-D-glucoză (36%) ⟶ β-D-glucoză (64%)

b) β-D-glucoză + H_2O + O_2 $\xrightarrow{GOD}$ D-glucono-δ-lactonă + H_2O_2

c)



β-D-glucoza este oxidată de glucozoxidază (GOD) la D-glucono-δ-lactonă. Apa oxigenată produsă în reacţia de oxidare a glucozei (b) este determinată cu ajutorul fenolului şi 4-amino-fenazonei în prezenţa peroxidazei, rezultând un produs colorat. Intensitatea culorii formate este o măsură a concentraţiei glucozei în probă.

Absorbţia soluţiei colorate poate fi măsurată între 450 şi 550 nm; absorbţia maximă este la 505 nm. Coeficientul de absorbţie depinde de condiţiile experimentului. Prin urmare, absorbanţa probei este comparată cu cea a glucozei standard.

BIBLIOGRAFIE

1. ADLER, R.G. *Biotechnology as an intelectual property.* Science, vol.223, N. 4647, 1984, pp. 357-363.
2. AIBA, S., HUMPHRY, A.S., NANCY, M.F. *Biochemical Engineering*, Academic Press, Inc. New York and London, 1993.
3. AIBA, S., KITAI, K and IMANAKA, T. *Cloning and expression of thermostable α-amylase gene from Bacillus stearothermophilus in Bacillus stearothermophilus and Bacillus subtilis.* Appl. Environ. Microbiol. 46, 1059, 1983.
4. AjinomotoCo.Inc.Jpn., Jpn.Kokai Tokkyo Koho, Bv.nr.6135797, 1986.
5. AKIMKINA, T.V. *Mol.Biol.* Moscova, 26(2), 418-23, 1992.
6. ALIHONIAN, S.Y. *Bazele genetice ale selecției microorganismelor.* Editura Nauka, Moscova, p.62.
7. AMORY, A., KUNST, F., ANBERT, E., KLIER, A., and RAPOPORT, G. *Characterization of the sac Q genes from Bacillus licheniform and Bacillus subtilis.* J.Bacteriol., 1987, 169: pp.324-333.
8. ANGHEL, I. și colab. *Biologia și tehnologia drojdiilor.* Vol. 3, Editura Tehnică, București, 1993.
9. ANSON, M.L. *J.Gen.Physiol.* 22, 79, 1939.
10. ANTONOVA, K.D., NICOSKA, T. *Acta Microbiol.* 28, 27-33, 1991, C.A.116,9.
11. AUNSTRUP, K. *New developments in the production and use of Bacillus proteases.* Abh. Akad. Wiss. D.DR.Abt. Math. Naturwiss. Tech. (3N.Mikros.Enzymprod), 1981, pp. 447-457.
12. AUNSTRUP, K. *Microorganism as producers of enzymes.* Microbiol. Ind. Aliment., Ann. Congr. Int. 3, Association Promot. Ind. Agric. Paris, 1979, pp. 77-96.
13. BANERJEE, R. *Bioprocess Engineering.* 7, 369-374, 1992.
14. BANU, C. *Biotehnologii în industria alimentară.* Editura Tehnică, București, 1987, p.54.
15. BARJANSKAIA, E.C. *Selecția dirijată a mutanților de Bacillus subtilis A-30 cu producție mărită de proteaze alcaline și analiza lor genetică.* Teză de doctorat, Moscova, VNII Genetika, 1976.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

16. BARNETT, C.C., BERKA, R.M., and FOWLER, T. *Cloning and amplification of the gene incoding an extracelular β-glucosidase from Trichoderma reesei: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates.* Bio/Technology, 9, 1991, pp. 562-567.
17. BAROZEVICI, E. *Supermutagenii.* Editura Nauka, Moscova, 1966, p.23.
18. BARTON, R. Brevet US 32 699181, Cl(95-66), 1966.
19. BERGMEYER, H.U. *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol. VI, 1983.
20. BERGMEYER, H.V. *Methods of Enzymatic Analysis.* Vol. VI, 1983.
21. BLOQUEL, R., VEILLET-PONCET, L. *Microbiologie-Aliment-Nutrition* 2, 1984, 179-185.
22. BLOW, D.M. Acc.Chem.Res., 9,145-152, 1976.
23. BODEA, C. *Tratat de biochimie vegetală.* Editura Academiei Române, 1964.
24. BORRISS, R., BAUMLEIN, H. and HOFEMEISTER, J. *Expression in Escherichia coli of a cloned β-gluconase gene from Bacillus amyloliquefaciens.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 22, 63.
25. BOUTROUX, L. *Compt.rend.*1880, 91, p.236
26. BRIDSON, E.Y. and BRECKER, A. *Design and formulation of microbial culture media.* In: *Methods in Microbiology*, Academic Press, London, vol. 3A, 1970, pp. 229-295.
27. BROCKERHOFF, H. *Lipolytic enzymes.* In: Advances in Chemistry Series, No. 136, Food Related Enzymes, American Chemical Society, New-York, 1974, pp.131-145.
28. BRODELIUS, P. *Industrial applications of immobilised biocatalyst.* In: Adv. Biochem. Eng., vol.10, Springer, p.75-129.
29. BRON, SIERD. *Plasmids, Molecular Biology Methods for Bacillus.* Edited by C.R.Hsrwood and S.M.Cutting, John Wiley 8, Sons Ltd., 1990.
30. BRUICE, T.C., BENKOVIC, S.J. *Bioorg. Mechanism.* 1, 1960, p.178.
31. BULICH, A.A. *Producing Pullulanase with Organisms Having a Superior Capacity to Elaborate Pullulanase.* U.K.Patent 1499340, 1978.
32. Bv. S.U.A. nr.3622459, 1970.
33. CHANDER, H., KLOSTERMEYER, H. *Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig.* C3, 1982, pp.427-431.
34. CHANG, S. and COHEN, S.N. *High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA.* M.G.G. 1979, 168, pp.111-15.
35. CHEN, T.S. *Biotechnol.Lett.* 13, 773-8, 1991.
36. CLARKE, L.E., GIBSON, R.F., SHERWOOD, R.F. and MINTON, N.P. *Expression of the Pseudomonas gene coding for carboxypeptidase 62 in Saccharomyces cerevisiae.* J.Gen.Microbiol., 1985, 131, 897.
37. CLOWES, R.C. *Experiments in microbiol.genetics.* 1970.
38. COLSON, C.A., CORNELIS, P.E., DIGNEFFE, C.S., WALON, R.G.P. and WALON, C. *Genetically Engineered Microorganisms for Massive Production of Amylolytic Enzymes and Process for Preparing Same.* UK Patent 2069503, 1981.

39. DAHL, M.K., MSADEK, T., KUNST, F., and RAPOPORT, G. *Mutational analysis of the Bacillus subtilis Deg U regulator and its phosphorylation by the Deg S protein kinase.* J.Bacteriol., 1991, 173: pp.2539-2547.
40. DALE, B.L. *Cellulose pretreatment: technology and techniques.* Annual reports on fermentation processes, 8, 1985, pp. 299-323.
41. DAN, V., IONESCU, A., HÎRTOPEANU, A., TOFAC, C., VASU, S., JURCOANE, ŞT. *Selecţionarea unor tulpini de Aspergillus niger, producătoare de glucozoxidază şi catalază.* Lucrările celui de-al IV-lea Simpozion de Microbiologie Industrială (volum), 1984, pp.303-307.
42. DEMAIN, A.L. *Catabolite regulation in industrial microbiology.* FEMS Symposium No 13, Academic Press London, 1983, pp. 3-20.
43. DEMAIN, A.L., SOLOMON, N.A. *Biology of Industrial Microorganisms,* Ed. The Benjamin Cummings Publishing Company, London, 1985.
44. DESMAZEND, M.J. *Enzymes utilizables en industries alimentaire.* Biofutures, 29, 104, 1985.
45. DEUTCH, A.H., RUSHLOW, K.E., and SMITH, C.J. *Analysis of the Escherichia coli proBA locus by DNA and protein sequencing. Nucleic Acids Res.* 1984, 12: pp. 6337-6355
46. DOMRACEVA, A.E. *Genetika.* 7, 1971, p.12.
47. DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles.* Academic Press, NewYork, 1998.
48. DUCROO, P. *Ind. Aliment. Agricole,* 99, 6, 1982.
49. DUMITRU, I.F., IORDĂCHESCU, D. *Introducere în enzimologie.* Editura Medicală, Bucureşti, 1981, p.144.
50. DWORSCHACK, R.G. and NELSON, C.A. *Production of Glucoamylase.* U.S. Patent 3660 236, 1972.
51. EIJINSK VINCENT, G.H. *Biochem.*J., 285(2), 625-8, 1992.
52. EIJINSK, G.H.V. *Protein Eng.,* 5, 421-6, 1992.
53. ENDO, S. *J.Ferment Technol.,* 40, 346-353, 1962.
54. ENNIS, B.M., GUTTIEREZ, N.A. and MADDOX, I.S. *The acetone-butanol-ethanol fermentation: a current assessment.* Process Biochemistry. 21, 1986, pp.131-147.
55. EXCOFFIER, G., TOUSSAINT, M.R. *Saccharification of steam exploded poplar wood.* Biotechnology and Bioengineering, 38, 1981, pp.1308-1317.
56. FAITH, W.T., NEUBECK, C.E. and REESE, E.T. *Production and applications of enzymes.* Adv.Biochem.Eng., 1971, 1, 77.
57. FAN, L.T., GHARPURAY, M.M. and LEE, Y.H. *Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues.* Biotechnol and Bioeng. Symp., 11, 1981, pp.29-45.
58. *Farmacopeea Română,* ed.X, Editura Medicală, 1992.
59. FERRARI, E., HENNER, D.J., PEREGO, M., and HOCK, J.A. *Transcription of Bacillus subtilis subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants.* J.Bacteriol., 1988, 170: pp.289-295.

60. FLOR, P.Q. and HAYASHIDA, S. *Production and characteristics of a row starch-digesting glucoamylase o from a protease-negative, glycosidase-negative Aspergillus awamori var. kawachi mutant.* Appl.Environ.Microbiol. 45, 905.
61. FLOREA, 0., DIMA, R. *Procese de transfer de masă şi utilaje specifice.* Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1984.
62. FOGARTY, W.M. and KELLY, C.T. *Microbial enzymes and Biotechnology.* Applied Science Publishers, London, 1983, pp.1-92.
63. FOGARTY, W.M. *Microbial enzymes and Biotechnology.* Applied Sciences Publishers, London, 1983.
64. FOGARTY, W.M., KELLY, C.T. *Microbial Enzymes and Biotechnology.* Second edition, Ed. Elsevier Applied, Biotechnology Series, 1990, pp.255-275.
65. FREIFELDER, D. *Microbial genetics.* Jones and Bartlett Publishers, Boston, London, 1989.
66. FROST, G.M., MOSS, D.A. *Production of Enzimes by fermentation.* Cap. 3, pp.134-143.
67. FROST, G.M., MOSS, D.A. *Production of Enzymes by Fermentation* in *Biotechnology* Vol. 7a. "Enzyme Technology" (editor J. F. Kennedy), Verlag Chemie, Weinheim, 1987. pp.65-212.
68. FROST. G.M., MOSS, D.A. *Production of Enzymes by fermentation.* Edited by John E.Sturge Limited Selby, North Yorkshire, England, 1985.
69. FROST. G.M., MOSS, D.A. *Production of enzymes by fermentation.* John & E.Sturge Limited Selby, North Yorkshire, England, 199-.
70. GÂRBAN, Z. *Noţiuni de biologie moleculară.* Timişoara, 1992, p.138.
71. GAUR, N.K., DUBNAU, E., and SMITH, I. *Characterization of a cloned Bacillus subtilis gene that inhibits sporulation in multiple copies.* J.Bacteriol., 1986, 168: pp.860-869.
72. GEHLEN, S. *IFAC Symp. Ser. 8* (Adv. Control Chem. Proceses) 273-8, 1992.
73. GHEŢIE, V., MICUSAN, V. *Analiza imunochimică.* Editura Academiei, Bucureşti, 1966.
74. GLUSZC, P., STARZAK, MICHALSKI, H. *Acta Biotechnologia.* vol. 8, nr. 2, 1988.
75. GODFREY,T., and REICHELT,J. *Industrial Enzymology. The Application of Enzymes in Industry.* MacMillan, Byfleet, U. K, 1983, p.2.
76. GOMA, G., BLANC, P. *Glucides: le possoble et le desirable.* Biofutur, nr.113, 1992, pp. 34-46.
77. GONG, C.S., CHEN, L.F., FLICKINGER, M.C. and TSAO, G.T. *Conversion of hemicellulose carbohidrates.* Advances in Biochemical Engineering, 20, 1981, pp. 93-118.
78. GREENFIELD, P.F., LAURENCE, R.L. *J.Food Sci,* 40, 906, 1975.
79. GRIFFIN. P.J. and FOGARTY, W.M. *Production of an amylolitic enzyme by Bacillus polymyxe in batch cultures.* J.Appl.Chem.Biotechnol. 23, 301,1973.
80. *Guide National de Prepscription de Medicaments,* Editions du Vidal, 1988, p.209.
81. HARODA, T., YOKOBAYASHI, K., and MISAKI, A. *Formation of isoamylase by Pseudomonas.* Appl. Microbiol. 16, 1439, 1968.

82. HARWOOD, C.R. and CUTTING, S. M. *Molecular Biology Methods for Bacillus.* Edited by John Wiley and Sons Ltd.,1990, p.76.
83. HAYLES, J., NURSE, P. *Genetics of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.* "Annual Revue of Genetics", 20, 1992, pp. 373-402.
84. HERIBAN V., SKARA J; STURDIK E; ILAVSKY J. Chem. Fac Slovak. Tech. Univ. 812 37 Bratislava, (Czech). Biotechnol. Tech., 1993 (1), 63-8, C.A. vol. 119, 5, 1993.
85. HESELTINE, C.W., and WANG, H.L. *Fermented foods.* Chem. Ind., London, 1979, p.393.
86. HIDETO, T. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, 56(3), 510-11, 1992.
87. HIGASHIHARA, M., and OKADA, S. *Studies on β-amylase of Bacillus megaterium strain No.32.* Agric.Biol.Chem.38, 1023, 1974.
88. HILL*, G.A., MACDONALD, D.G. and LANG, X., *α-Amilase inhibition and inactivation in barley malt during cold starch hydrolysis.* Biotechnology Letters, vol. 19, No.11, November, 1997, pp. 1139-1141.
89. HIRATA, H., NEGORO, S. and OSADA, H. *High production of thermostable β-galactosidase of Bacillus stearothermophilus in Bacillus subtilis.* Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49, 1547.
90. HIROKI, T. *Agric.Biol.Chem.* 55(12), 1991, pp.3099-101.
91. HIROSHI, T., MIKIO, T. Bv.482879, 1992.
92. HITOTSUYANAGI, K., YAMARA, K. and MARUO, B. *Stepwise introduction of regulatory genes stimulating production of α-amylase into Bacillus subtilis: Construction of an α-amylase extrahyper producing strain.* Agric. Biol. Chem. 43, 2343, 1979.
93. HOLLAND, D.R. *Biochem.*, 31(46), 11310 (1992), C.A.117, 25.
94. HONJO, M., NAKAYOMA, A., FUKAZAWA, K., KAWAMURA, K., ANDO, K., HORI, M., and EURUTANI, Y. *A novel Bacillus subtilis gene involved in negative control of sporulation and degradative – enzyme production.* J.Bacteriol., 1990, 172: pp.1783-1790.
95. HORVECKA, D. *Przem. Spozyw.* 38, 27-35, 1984, Chem.abstr.105, 3, 23030k, 1986.
96. HU, WENGIWANG, LIEI, *Human Ehifon Daxue Ziran Kexue Xuebao*, 15(1), 1992, pp.64-7.
97. INGLE, M.B. and ERICKSON, R.J. *Bacterial α-amylase.* Adv. Appl. Microbiol. 24, 257, 1978.
98. IONIȚĂ, A., HORIG, S. and JURCOANE, Șt. *Studies concerning the Proteinase and Amylase Production in Subnergel Liquid Culture of an Aspergillus oryzae Mutant Strain.* Vol. 3, nr. 3, Romanian Biotechnological Letters, 1998, pp. 257- 262.
99. IORDĂCHESCU, D., DUMITRU, I.F. *Biochimie practică.* București, 1986.
100. IORDĂCHESCU, D., DUMITRU, I.F. *Biochimie practică.* București, 1980, p.133.
101. ISOWA, Y. Bull.Chem.Soc.Jpn., 50, 2762-2765, 1977.
102. ISOWA, Y. Bull.Chem.Soc.Jpn., 50, 2766-2772, 1977.
103. ISOWA, Y. Bull.Chem.Soc.Jpn., 51, 271-276, 1978.
104. ISOWA, Y. Bull.Chem.Soc.Jpn., 52, 796-800, 1979.
105. IWAI, M., TSUJISAKA, Y. *Agr. Biol. Chem.* 38(6), 1974, pp.1241-1247.

106.JANSHEKAR, H. and FIECHTER, A. *Lignin: biosynthesis, application and biodegradation.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 27, 1983, pp.119-178.

107.JIMENEZ, M.A. Proc.Eur.Pept.Symp., 1990, C.A.113, 17.

108.JOYET, P., GUERINEAU, M. and HESLOT, H. *Cloning of a thermostable α–amylase gene from Bacillus licheniformis and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis.* FEMS Microbiol.Zett., 1984, 21, 353.

109.JURCOANE, ŞT. Teză de doctorat cu titlul: *Purificarea şi caracterizarea proteazelor microbiene cu aplicaţii în biotehnologie.* Academia Română, 1995.

110.JURCOANE, ŞT., DIACONU, L., KISS, G.B. *Izolarea şi caracterizarea plasmidei din B.subtilis şi E.coli introduse prin transformare în B.subtilis.* Roum. Biotech. Letters, vol.2, No.3, 1997, pp. 207-216.

111.JURCOANE, ŞT., HORIŢĂ, S., IONIŢĂ, A. *Procedeu de obţinere a glucozoxidazei cu o tulpină de Aspergillus niger var.phoenicis.* Brevet nr.95-02217, Cl.12 N 9/62, România, 1995.

112.JURCOANE, ŞT., HORIŢĂ, S., IONIŢĂ, A., TEACENCO, L., TEODOR, E., PROTOPOPESCU, A. *Production and purification of Glucose Oxydase from Aspergillus niger MIUG 55.* Roum.Biotechnol.Lett., vol.3, no.1, 1998, pp.9-14.

113.JURCOANE, ŞT., IONIŢĂ, A., MOCANU, E., RAIANU, G., GEICU, S., GOMOTÎRCEANU, P., GABRIEL, GH. *Procedeu de obţinere a L-lizinei prin fermentaţiei.* Brevet nr.109221, 1994.

114.JURCOANE, ŞT., POPA, 0., VAMANU, A., LONIŢĂ, A., IONESCU, A. *Curs de biochimia şi biotehnologia obţinerii proteinelor şi enzimelor.* ("Proteine", partea I). Tipografia USAMV, Timişoara, 1995.

115.KAPTI, K., MICHIO, K. *Microb. Util. Renewable Resourse,* 7, 38-45, 1991, C.A.117,9.

116.KASAI, N. *Agric. Biol. Chem.,* 48, 6, 1984.

117.KATKOCIN, D.M., WORD, N.S. and YANG, S.S. *A Novel Thermostable Glucoamylase and Method for its Production.* U.K.Patent 2145 094, 1985.

118.KATSUMI, T. *Biotechnol. Biochem.* 56(2), 246-50, 1992.

119.KEAY, L., WILDI, S. *Biotechnol. and Bioeng.* 12, 179-912, 1970.

120.KELLY, C.T. *Proc.Biochem.,* 11, 6, 3, 1976.

121.KERTESZ, Z.I. *The Pectic Substance.* Iterscience Publisher, Inc. New-York, Basel, 1987.

122.KIKOMON CORP., Bv.Japonia nr.60.126.082/1985, Chem.Abstr., 103, 159121g, 1985.

123.KLAPPER, B.F., JAMESON, D.M. *Biochem. and Biophis.* Acta, 304, 505, 1973.

124.KOISHI, M. Jpn.Kokai Tokkyo Koho Bv.nr.89281085, 1989.

125.KOLEVA, A., IVANOVA, T. 37(3),159-69, 1990.

126.KOMORI AKYOSHI; NISHII YUZURU, MAESATO, Kensho Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 60 217 897(85 217 897) C1 C 12 P 7/56) 1984, C.A. vol. 104, No 9, 1986.

127.KORASIC, N., ZAJIC, J.E., ABOUE, G., JACK, T., GERSON, D. *Biotechnol. Bioeng.* 21, 1979, pp.1133-1149.

128.KRAWIEC, S., RILEY, M. *Organisation of bacterial chromosome.* Microbiological Rewiews, 54, 1990, pp. 502-589.

129.KUDO, T., OHKOSHI, A. and HORIKOSHI, K. *Molecular cloning and expression of a xylanase gene of alkalophilic Aeromonas sp No.212 in Escherichia coli.* J.Gen. Microbiol., 1985, 131, 2825.

130.LAEMMLI, U.K. *Nature.* 227, 680-685, 1970.

131.LAMAR, R.T. *The role of fungal lignin-degradation enyimes in xenobiotic degradation.* Current opinion of Biotechnology, 3, 1992, pp.261-266.

132.LAMBERT, P.W. *Industrial enzyme production and recovery from filamentous fungi.* Vol.4, "Fungal technology" (J. E. Smith, D.R.Berry, and B. Kristiansen), Edward Arnold, London, 1983, pp 210-237.

133.LAPAGE, S.P., SHELTON, J.E., MITCHELL, T.G. and MACKENZIE, A.R. *Culture collections and the preservation of bacterie.* In: *Methods in Microbiology*, Academic Press, London, 1970, 3A, pp.135-228.

134.LASATER, G.D., and SMITH, M.B. *High Potency Glucoamylase and alpha Amylase Enzyme System by cultivation of Aspergillus niger.* U.K.Patent, 2016, 476, 1979.

135.LEHNINGER, A.L. *Biochimie.* 1, Editura Tehnică, Bucureşti, 1987, p.214.

136.LERUSALINSKII, N.D. *Bazele fiziologiei microbilor.* Editura Nauka, Moscova, 1963, p.121.

137.LEWIN, B. *Genes.* Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 1997.

138.LIPMAN, D.J. and PEARSON, W.R. *Rapid and sensitive protein similarity searches.* Science, 1985. 227: pp.1435-1441.

139.LORENZ, M.G., Wackernagel, W. *Bacterial gene transfer by Natural Genetic Transformation.* In the: "Environment Microbiological Reviews", 58, 3, 1994, pp. 563-602.

140.LOWRY, O.H., ROSENBROUGH, J.N., FARR, A.L., RANDALL, R.P. J.Biol. Clen. 193, 265, 1951.

141.MAGEE, R.J., KOSARIC, N. *Bioconversion of hemicellulotics.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 38, 1985, pp.1-52.

142.MALIK, M. Pak.J.Sci. Ind. Res. 34(2) 91-4, 1991.

143.MANDELS, M. *Cellulases.* Annual Reports on Fermentation Processes. 5, 1981, pp.35-78.

144.MANTOVANI GIORGIO şi colab. Eur. Pat. Appl. EP 517, 343 (C1 C 12, P 7/56) 1992, C.A. vol. 118, 11, 1993.

145.MARCHAL, R., REPARS, M., POURQUIE, J., FAYOLLE, F.I., VANDECASTEELE, J.P. *Large scale enzymatic hydrolysis of agricultural biomass.* Part.2: "Conversion into acetone-butanol". Bioresource Technology, 42, 1992, pp. 205-217.

146.MARKKANEN, P.H. and BOILEY, M.J. *Simultaneous production of α-amylase β-glucanase and proteolytic enzymes' by Bacillus subtilis.* J.Appl. Chem. Biotechnol, 1974.

147.MASLOWSKI, B. (Akademia Exonomicza, Wroclaw) Pol. PL 144 390 (cl C 12 P 7/56), 31 May, 1988, Appl. 251 344, 28 Dec. 1984, C.A., vol. 111, 9, 1989.

148.MASOACHI, Y. Nippon Shokuhin Kogyo Cekkaishi 38(10), 954-61, 1991.

149.MATSUBARA, H. Arch. Biochem.Biophys., 115, 324, 1966.

150.MATSUBARA, H. Biochem Biphys.Res.Commun., 14, 719, 1966.

151.MATSUBARA, H. Biochem. Biophys.Res. Commun. 24, 427, 1966.

152.MATSUBARA, H. Biochem.Biophys.Res.Commun., 21, 242, 1965.
153.MATSUBARA, H. J.Biol.Chem., 243, 1732, 1968.
154.MATSUBARA, H. *Molecular Mechanism of Temperature Adaptation*. 1967, p.283.
155.MATSUBARA, H. *The Enzymes*. Academic Press New York, 3rd.ed., 1991, p.765.
156.MATSUBARA, H., FEDER, J. *The Enzymes*. Academic Press, New York, 3, 1971, p.721.
157.MATSULEVICI, N.A., CESNIKOV, YU G. *J.Prikl.Him.*, 1989, 62(9), 1950-1954.
158.MEERS, J.L. *The regulation of α-amylase production in Bacillus licheniformis*. Antonie van Leenwenhock, 38, 585, 1972.
159.MENCINICOPSCHI, GH., BRĂGĂREA, ST. *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene*. Editura Didactică şi Pedagogică, 198-.
160.Merck-Catalogue appl.Copyright, Merck Darmstadt.
161.MICHIHIKO, S. Schokuhiu Sogo Kenkyusho Knkin Hokoku, 55, 49-51, 1991.
162.MIELENZ, J.R. and MICKEL, S. *A process for cloning the gene coding for a thermostable α–amylase into Escherichia coli and Bacillus subtilis*. Eur.Patent, 1982, 57, 976.
163.MIKI, K. Jpn.Kokai Tokkyo Koho Jp. 9288963, 1992.
164.MIKI, K., HIROHITO, M. Jpn.Kokei. Tokkyo Koho Bv.91161447, 1989.
165.MING, CHU., LEECHAMPION, LITSUSHUN, *Enzyme Microbiol.Technol.*, 14(9) 1992, pp.755-61.
166.MOLLIARD, N. *Compt.rend.*1928, 174, p. 881.
167.MONSON, P. Patent S.U.A. 3557002, 1971.
168.MONSON, P., COMBES, D. *Biotech.* 84,1, 1984, p.385.
169.MONSON, P., COMBES, D. *Enz.Eng.*, 7, 379, 1984.
170.MORBACH, S., SAHM, EGGELING, L. *Use of feedback-resistant threonine dehydratases of Corynebacterium glutamicum to increase carbon flux towards L-isoleucin*. App. Environmental Microbiology, vol.6, nr.12, 1985.
171.MORIHARA, K. *Adv.Enzymology*. 41,179-243, 1974.
172.MORIHARA, S. *Agric.Biol.Chem.* 55, 2099-103, 1991.
173.MORIKAWA, K. *Biochem.Biophys.*Res.Commun., 84, 95-101, 1978.
174.MUKAI, K., KAWATA, M., and TANAKA, T. *Isolation and phosphorylation of the Bacillus subtilis deg S and deg U gene products*. J.Biol.Chem., 1990, 265: pp.824-834.
175.MUKAI, K., KAWATA-MUKAI, M., and TANAKA, T. *Stabilisation of phosphorylated Bacillus subtilis Deg U by Deg R*. J.Bacteriol., 1992, 174: pp.7954-7962.
176.N. KOSARIC, J.E. ZAJIC, C. ABONC, Biotechnol.and.Bioen. XXI, 1979, pp.1133-1149.
177.NAGAMI, Y., and TANAKA, T. *Molecular cloning and nucleotide sequence of a DNA fragment from Bacillus natto that enhances production of extracellular proteases and levansucrase in Bacillus subtilis*. J.Bacteriol. 1986, 166, pp.20-28.
178.NAKADAI, T., NASUNO, S. *Agric.Biol.Chem.*, 37, 2703, 1973.
179.NAKASHIMA, T., FUKUDA, H., NOJIMA, Y., NAGAI, S. *J. Ferment. Bioeng.* 68(1), 1989, pp.19-24.
180.NAPIER, E.J. *β-Amylases*. U.S.Patent, 4011, 136, 1977.

181.NASUNO, S. *J.of Gen.Microb.*, 70, 29, 1972.

182.NATIVEL, F., POURQUIE, J., BALLERINI, D., VANDECASTEELE, J.P. and RENAULT, PH. *The biotechnology facilities at Soustons for biomass conversion.* International Journal of Solar Energy, 11, 1992, pp.219-39.

183.NEAMȚU, G. *Biochimie vegetală.* Editura Ceres, București, 1981.

184.NENIȚESCU, C.D. *Chimie organică.* Vol.II, Ed. a VI-a, Editura Didactică și Pedagogică, București, 1968.

185.NIELSEN, S. C., DIERS, I.V., OUTTRUP, H., and NORMAN, B. E. *Debranching Enzyme Product Preparation and Use Thereof.* UK Patent 2097405, 1982.

186.NOMURA et.al. *Construction of a transducing phage ρ 11 containing α-amylase structural gene of Bacillus subtilis.* Agric.Biol.Chem. 43, 2637, 1979.

187.NORMAN, B.E. *New development in starch syrup technology.* Applied Science Publishers, London, 1981, pp 15-50.

188.NOVO INDUSTRIA/s.*Enzymes Division*, Denmark prospect de prezentare.

189.OBARA, HITOMI (Schimadzu Corp) Jpn. Kokai Tokkyo Koho, J.P. 0191,788 (8991788) C.A. 111 (9)/1989.

190.OGURA, M., KAWATA, M., ITAYA, M., TAKIO, K. and TANAKA, T. *Multiple copies of the proB Gene enhance deg S – Dependent extracellular protease Production in B.subtilis.* Journal of Bacteriology, sept.1994, pp. 5673-5680.

191.OKADA, J., SHIHOGAKI, H., MURATA, K. and KIMURA, A. *Cloning of the gene responsible for the extracellular proteolytic activities of Bacillus licheniformis.* Appl.Microbiol.Biotechnol., 1984, 20, 406.

192.OLSSON, A., HAGSTROM, T., NILSSON, B, UHLEN, N. and GATENBECK, S. *Cloning of Bacillus sphaerious penicillin V amidase gene and its expression in Escherichia coli and Bacillus subtilis.* Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49, 1084.

193.ONISCU, C. *Tehnologia produselor de biosinteză.* Editura Tehnică, București, 1978.

194.OREN, A. *A thermophilie amyloglucosidase from Halobacterium sodomense, a halophilic bacterium from the Dead Sea.* Curr.Microbiol. 8, 225, 1983.

195.OTA, Y., GOMI, K., KATO, S., SUGIURA, T., MINODA, Y. *Agr. Biol. Chem.* 46(12), 1982, pp.2885-2993.

196.OUTTRUP, H. and NORMAN, B.E. *Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of Bacillus modified by recombinant DNA techniques.* Stärke, 1984, 36, 405.

197.OUTTRUP, H. and NORMAN, B.E. *Properties and application of a thermostable maltogenic amylase produced by a strain of Bacillus modified by recombinant DNA techniques.* Stärke, 36, 405, 1984.

198.OUTTRUP, H., DIDERICHSEN, B.K. and CHRISTIANSEN, L. *Maltogenic Amylase Enzyme Product, Preparation and Use Thereof.* Eur.Patent Appl. 120693, 1984.

199.PAL, N., DAS, S., KUNDU, A.K. *J. Ferment. Technol.* 56(6), 1978, pp.593-598.

200.PANBANGRED, W., FUKUSAKI, E., EPIFANIO, E.C., SHINHYO, A. and OKADA, H. *Expression of a xylanase gene of Bacillus pumilus in Escherichia coli and Bacillus subtilis.* Appl. Microbiol. Biotechnol., 1985, 22, 259.

201.PANG, A.S.H., NATHOO, S., and WONG, S.L. *Cloning and characterization of a pair of novel genes that regulate production of extracellular enzymes in Bacillus subtilis.* J.Bacteriol., 1991, 173: pp.46-54.

202.PARISI, F. *Advances in lignocellulosics hydrolysis and the utilisation of the hydrolizates.* Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, 32, 1989, pp.61-93.

203.PARKINSON, J.S. *Signal transduction shemes of bacteria.* Cell, 1993, 73: pp.857-871.

204.PASHINIA, E.I. *Maslo-z hirovaja promyshlennost*, Moscova, 2, 19-20, 1984.

205.PELE, M., POPESCU, N. R., MOHOREA, A. R., STĂNESCU, C. *Procedeu pentru obținerea unui preparat enzimatic pectolotic pe mediu semisolid.* Brevet de invenție Ro. 100 893 (Cl C12)1991, 1998.

206.PEREGO, M., and HOCK, J.A. *Sequence analysis and regulation of the hpr locus, a regulatorz gene for protease production and sporulation in Bacillus subtilis.* J.Bacteriol., 1988, 170: pp.2560-2567.

207.PERSSON, I., TJERNEDID, F. and HAHN-HAGERDAL, B. *Fungal cellulolytic enzyme production: a review.* Process Biochemistry, 26, 1991, pp.65-74.

208.PINCHES, A., LOUW, M.E. and WATSON, T.G. *Growth plasmid stability and α–amylase production in batch fermentations using recombinants Bacillus subtilis strain.* Biotechnol. Lett., 1985, 7, 621.

209.POURQUIE, J. et VANDECASTEELE, J.P. *Conversion de la biomasse lignocellulosique opar hydrolyse enzimatique et fermentation.* In: Rene Scriban, Biotechnologie, 4e edition, 1993.

210.POURQUIE, J., WARZIWODA, M., CHEVRON, F., THERY, M., LONGCHAMP, D., and VANDECASTEELE J.P. *Scale up of cellulases production and utilization.* In: Aubert J.P., Beguin P. and Millet J. Ed. FEMS, Symposium nr.43, "Biochemistry and genetics of cellulose degradation". Academic Press Ltd. London, 1988, pp.71-86.

211.PRAVE, P., FAUST, U., SITTING, W. and SUKATSCH, D.A. *Biotechnology.* A students Guide, VCH- Publisher, 1978.

212.RATLEDGE, C. *Fermentation substrates* in: *Annual Reports on Fermentation Processes.* Academic Press, New York, 1977, I, pp.49-71.

213.RAUL, M., MUNTEANU, 0. *Reactoare chimice.* Litografia Institutului Politehnic București, 1983.

214.REHM, M.J., REED, G. *Biotechnology A. Comprehensive Treatise.* In 8 vol., VCH, Weinheim, 1981 – 1987.

215.RINTU, P. *Biotechnolo.Liett.*,14(4)301-4, 1992.

216.ROBYT, J. and FRENCH, D. *Purification and action pattern of an amylase from Bacillus polymyxa.* Arch.Biochem.Biophys., 1964, pp.104-338.

217.ROPARS, M., MARCHAL, R., POURQUIE, J., and VANDECASTEELE, J.P. *Large scale enzymatic hydrolysis of agricultural biomass.* Part 1: "Pretreatment procedures". Bioresource Technology, 42, pp.197-204.

218.ROSE, A.H. *Microbial Enzymes and Bioconversion.* Acad. Press London, New-York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1980, p.51.

219.ROSE, L.H. *Chem.Engineering.* 1974, 5, 13.

220.SACCO, M., MILLET, J. and AUBERT, J.P. *Cloning and expression in Saccharomyces cerevisiae of a cellulase gene from Clostridium thermocellum.* Ann. Microbiol. (Paris), 1984, 135A, 485.

221.SAITO, H., MIURA, K. *Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment.* Biochimic and Biphysic Acta, 72, 1963, pp 618-629.

222.SAITO, N. and YAMAMOTO, K. *Regulatory factors affecting α-amylase production in Bacillus licheniformis.* J.Bacteriol.121, 848, 1975.

223.SALVATORE, T. *Biochemistry.* 30(1), 97-106, 1991.

224.SANTOS, J.A.L., CABRAL, J.M.S., COONEY, C.L. *Bioprocess Eng.* 7 (5), 205-211, 1992, Chem.Abstr. **116**, 192524g, 1992.

225.SARDINAS, J.L. *Renin enzyme of Endothia parasitica.* Appl. Microbiol., 1968, 16, 248.

226.SĂSĂRMAN, E. *Comunicare personală.* 1997.

227.SĂSĂRMAN, E. *Obţinerea şi caracterizarea mutantelor producătoare de L-lizină.* Teză de doctorat, 1979.

228.SĂSĂRMAN, E., JURCOANE ŞT. *Mcrobiologie industrială.* Editura Mirton, Timişoara, 2000.

229.SĂSĂRMAN, E., SÂRBU, C., MOCANU, E,, DOBROVOLSKI, D. *Fuziunea protoplaştilor bacterieni şi analiza genetică a recombinanţilor.* Lucrările celui de-al 5-lea Simpozion de Microbiologie Industrială şi Biotehnologie-Iaşi, 1986.

230.SASHIHARA, N, KUDO, T. and HORIKOSHI, K. *Molecular cloning and expression of cellulase genes of alkalophilic Bacillus sp. strain N-4 in Escherichia coli.* J.Bacteriol., 1984, **158**, 503.

231.SAWAGUKI, K. Jpn.Kokai Tokkyo Koho, Bv.nr.9143079, 1991.

232.SCHILL, W.B., SCHUMACHER, G.F.B. *Anal.Biochem.*, 46, 502, 1978.

233.SCHMIDT, R.D. *Advanc.Biochem.Eng.*, 12, 41, 1979.

234.SCRIBAN, R. *Biotechnology.* Ed. Technique & Documentation-Lavoisier, Paris, 1984.

235.SHAHANI, K. M. *Lipases and Esterases.* In: *Enzimes in Food Procesing* (editor G. R. Reed), 2nd Ed., Academic Press, New-York, 1975, pp.181-217.

236.SHIGENORI, U. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 26, 876-86, 1987.

237.SHIRU, J., SHUCIN, Z. *Shipin Yu Fajiao Gongye*, 5, 28-31,17, 1991.

238.SIKYTA, B. and KYSLIK, P. *Selection of Escherichia coli with increased endoenzyme synthesis in continuous culture. Advances in Biotechnology*, vol.1, 1980, pp 215-220.

239.SIMIONOVICI, M., CÂRSTEA, AL., VLĂDESCU, C. *Cercetarea farmacologică şi prospectarea medicamentului.* Editura Medicală, Bucureşti, 1983.

240.SOLEV, V. *Microbios.*, 66, 157-71, 1991. Chem.Abstr.115, 15.

241.SOOG L.H. *Misaengemul hakhoecki.* 29(3), 167-71, 1991.

242.STANISICH, V.A. *Identification and analysis of plasmids at the genetic level.* In: *Methods in Microbiology Plasmid Technology*, Academic Press, London, 17, 1984, pp. 5-32.

243.STOICA, M.. *Lucrările Institutului de Cercetări şi Proiectări Alimentare.* Vol.I, 1972, p.199.

244.STREYER, L. *Biochemistry.* Standford Univ.New York. 1988

245.STRONING, A. *Proteins Sequences Data Anal.* 4(6), 355-61, 1991.

246.SUZUKI, Y. and IMAI, T. *Bacillus stearothermophilus KP 1064 pullulan hydrolase. Its assignment to a unique type of maltogenic α-amylase but to neither pullulanase nor isopullulanase.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 20, 1985.

247.SVENSSON, B., PEDERSEN, T.G., SVENDSEN, I., SAKAI, T. and OTTESEN, M. *Characterisation of two forms of glucoamylase from Aspergillus niger.* Carlsberg Res.Commun. 47, 55, 1982.

248.ŞERBAN, M., ROŞOIU, N. *Substanţe biologic active din organisme marine.* Editura Academiei Române, Bucureşti, 1992.

249.TAKASAKY, Y. *Studies on amylases from Bacillus effective for production of maltose. Productions and utilisations of β-amylase and pullulanase from Bacillus cereus var.mycoides.* Agric.Biol.Chem. 40, 1515, 1976.

250.TAKEMOTO, H. (Toyo Soda Mfg.Co.), Bv.Japonia nr.61.12384/1986, Chem.Abstr., 104(21),184875j, 1986.

251.TAKIZAWA, N. and HUROOKA, Y. *Cloning of the pullulanase gene and orerproduction of pullulanase in Escherichia coli and Klebsiella aerogenes.* Appl.Environ. Microbiol. 49, 294, 1985.

252.TAMURI, M., YOKOSUKA, M., KANNO, M. and ISHI, Y. *Heat and Acid-Stable α-Amylase Enzyme and Processes for Producing the Same.* U.S.Patent 4284722, 1981.

253.TANAKA TAND SAKAGUCHI. *Construction of Recombinant Plasmid.* 1978.

254.TANAKA, T., KAWATA, M., NAGAMI, Y., and UCHIYAMA, H. *Prt R enhances the mRNA level of the Bacillus subtilis extracellular proleases.* J.Bacteriol., 1987, 169, pp.3044-3050.

255.TATSUKI, OKA. *J.Biochem.* 88, 807-813, 1980.

256.TEERI, T.T., REINIKAINEN, T., ROUHONEN, L., JONES, T.A. and KNOWLES J.C.K. *Domain function in Trichoderma reesei cellobiohydrolases.* Journal of Biotechnology, 24, 1992, pp.169-176.

257.TINGZHOU, Z., WEISHENG. *Wuxue Zazhi*, 11(1), 6-13, 85, 42, 1991.

258.TURKER, M., HUBLE, J.J. *Membr.Sci.*, 1987, 34(3), 267-281.

259.UENG, P.P., VOLPP, K.J., TUCKER, J.V., GONG, C.S. and CHEN, I.F. *Molecular cloning of the Escherichia coli gene encoding glucose isomerase.* Biotechnol., Lett., 1985, 7, 153.

260.ULMANEN, L., LUNDSTROM, K., LEHTOVAARA, P., SAROAS, M., RUOHONEN, M. and PALVA, I. *Transcription and translation of foreign genes in Bacillus subtilis by the aid of a secretion vector.* J. Bacteriol. 162, 186, 1985.

261.VAGAMOVA, T.I. *Biochimia.* 54, (1), 125-35, 1987.

262.VALLINO, Y.J., STEPHANOPOULOS, G. *Carbon flux distributions at the pyruvate branch point in Corynebacterium glutamicum during lysine overproduction.* Biotechnological Progress, vol.10, nr.3, 1994.

263.VALLINO, Y.J., STEPHANOPOULOS, G. *Metabolic flux distributions in Corynebacterium glutamicum during growth and lysine overproduction.* Biotechnology and Bioengineering, vol.41, nr.6, 1993.

264. VAN den BERG, R.B. *Proces tehnologic*, 1987, 10, 49-53, *Chem.Abstr.*, 1988, 108, 96845b.

265. VAN DEN BERG, R.B., SMOLDERS, C.A. Filtr.Sep. 25(2), 115-121, 1988, Chem. Abstr. 108, 223650m, 1988.

266. VAN den BERG, R.B., SMOLDERS, C.A. *Filtr.Sep.*, 1988, 25(2), 115-121, *Chem. Abstr.*, 1988, 108, 223650m.

267. VASILESCU, I. *Enzimele*. Editura Academiei, Bucureşti, 1961.

268. VASILESCU, I. *Tehnologia enzimelor*. Editura Tehnică, Bucureşti.

269. VASU, S., DAN, V., HÎRTOPEAN, A., JURCOANE, ŞT., IONIŢĂ, A. *Activitatea glucozoxidazică şi catalazică a unor tulpini de Aspergillus folosite la obţinerea gluconatului de calciu*. Al IV-lea Simpozion de Microbiologie Industrială, vol., 1984, pp.345-349.

270. VASU, S., DAN, V., IONESCU, A., KRAMER, C., MUSCĂ, I.. *Lucrările celui de-al III-lea Simpozion de Microbiologie Industrială*. 1982, pp 74-77.

271. VASU, S.S. *Enzime Pectolitice din Aspergillus niger*. Teza de doctorat, Universitatea Bucureşti, 1973.

272. VOET, D., VOET, J.G. *Biochemistry*. Willy Ed.1990.

273. VORTRUBA, J., EMANUILAVA, E., KAYMAKCHIEV, A. and PAZLAROVA, J. *Kinetics of α-amylase production in a continuous culture of Bacillus licheniformis*. Folia Miocrobiol (Prague) 29,19, 1984.

274. VRIJIC, M., KRONEMEYER, W. SAHM, H., EGGELING, L. *Unbalance of L-lysine flux in Corynebacterium glutamicum and its use for the isolation of excretion defective mutants*. J.Bact., vol.177, 1995.

275. WANG CHUANHUAI, ZHANG, GUSBAO, YU HANG et. al. (Nanjing, University) Faming Zhuanli Shenging Gongkai Schuomingshu CN 1, 031, 112.

276. WANG, RONMING; CHONG, PENG SHI XIANFENG; et.al. *Dancheng County Biochemistry Factory*. Faming Zhuanli Shenging Cougkai Shuomingahn (cl C 12 P 7/56, 25 oct 1989) C.A. vol 113 No 9, 1989, 111, 3.

277. WANG, RONMING; ZHANG, PENG SHI XIANFENG, SUN YAO ZHANG, ZHANG MINGGI; et.al. CN 87, 107, 162 (cl C12 P 7/56), 1987.

278. WANG, T.T. *Biochem.J.*,153, 691-699, 1976.

279. WILDI, B.S., KIRKWOOD, T., VESTMAN, L. Bv.S.U.A., 3.634.258, 1972.

280. WILHELM, S. *Eur.J.Biochem.*, 207(2), 781-91, 1992.

281. WILLETTS, N. *Conjugation*. In: "Methods in Microbiology Plasmid Technology", vol.17, Academic Press, London, 1984, pp. 33-59.

282. WILLETTS, N. *Conjugation*. In: *Methods in Microbiology Plasmid Technology*, Academic Press, London, 1984, 17, pp. 33-59.

283. WOLFGANG, G. *Enzyme in Industry*. VCH, 1990.

284. WONG, S., WANG, F., and DOI, R.H. *Cloning and nucleotide sequence of sen N, a novel Bacillus natto (B.subtilis) gene that regulates expression of extracellular protease genes*. J.Gen.Microbiol., 1988, 139: pp.3264-3276.

285. WOODRUFF, H.B. *A microbiologist's view of Biotechnology*. In: "Biotechnology and Bioengineering Symp. 13, 1-4, 1983.

286.WUHAN, Z.Y. *Daxue Xuebao Ziron Kzueban.* 3, 1990, pp. 95-101.

287.YAMANE, K. and SHINDMIYA, A. *Bacillus subtilis α-amylases: Regulation of production and molecular cloning.* In: "Microbiology", American Society for Microbiology, Washington D.C., 1982, pp. 8-11.

288.YAMAZAKI, T., KAZUO, I. Jpn.Kokai Tokkyo Koho, Bv.nr.91277280, 1992.

289.YANG BIN, *Gongye Weishengwu,* 22(4), 6-9, 13(1992).

290.YANG, M., FERRARI, E., CHEN, E., and HENNER, D.J. *Identification of the pleiotropic sacQ gene og Bacillus subtilis.* J.Bacteriol., 1986, 166: pp.113-119.

291.YANG, M., SHIMOTSU, H., FERRARI, E., and HENNER, D.J. *Characterization and mapping of the Bacillus subtilis prtR gene.* J.Bacteriol., 1987, 169: pp.434-437.

292.YKUNOSHIN, K. Jpn.Kokai Tokkyo Koho, Bv.nr.01238510, 1988.

293.YONEDA, Y., GRAHAM, S. and YOUNG, F.E. *Cloning of a foreign gene coding for α-amylase in Bacillus subtilis.* Biochem.Biophys.Res.Commun. 91, 1556, 1979.

294.YOSHIO, F. Jpn. Kokai Tokyo Koho, Bv. 90195879, 1989.

295.YOYOJI, S. Jpn. Kokai Tokyo Koho, Bv. 91191781, 1991.

296.ZAKRZEWSKI, A.M. *The effect of the type of fermenter on the biosynthesis of proteoytic enzymes by Bacillus subtilis* 40. Abh. Akad.Wiss.DDR Abt. Math. Naturwiss. Tech. (3N, Mikros.Enzymprod.), 1981, pp. 481-486.

297.ZARNEA, G. *Microbiologie generală.* Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, 1970, p.650.

298.ZARNEA, G., MENCINICOPSCHI, GH., BRĂGĂREA, ŞT. *Bioingineria preparatelor enzimatice microbiene.* Editura Tehnică, Bucureşti, 1980, p.349.

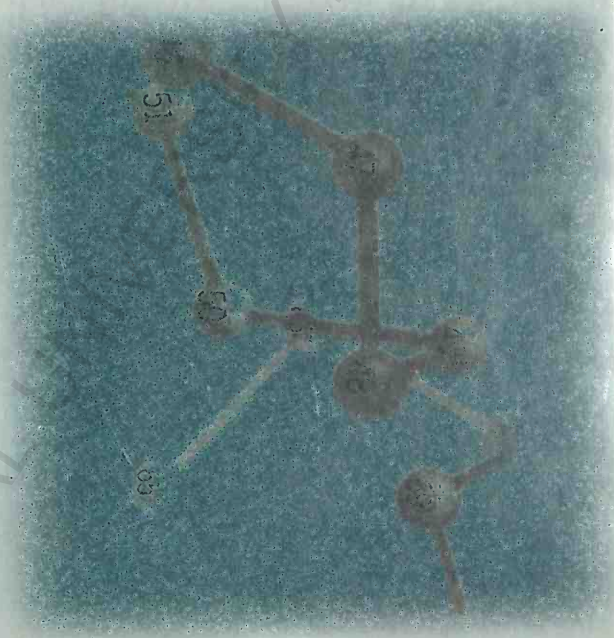
299.ZINK, R.T. and CHATTERJEE, A.K. *Cloning and expression in Escherichia coli of pectinase genes of Erwinia carotovora subsp. carotovora,* Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49, 714.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Realizată pe baza ultimelor noutăți în domeniu, lucrarea reprezintă o sinteză a principalelor aspecte legate de elaborarea unui proces de biosinteză a compușilor: aminoacizi, alcooli, acizi organici, cu accent pe obținerea și purificarea enzimelor.

Descoperirile științifice din domeniul geneticii microorganismelor au condus la o altfel de abordare a biotehnologiilor clasice, oferind soluții de rentabilizare a acestora și, totodată, la extinderea domeniilor de aplicații.

Cartea se adresează cercetătorilor, cadrelor universitare, studenților și tuturor specialiștilor dornici de cunoștințe noi în domeniul biotehnologiei și bioingineriei.



Universitaria

ISBN 973-31-1465-0

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY